

The background of the slide features a grid of laboratory glassware. On the left, a large Erlenmeyer flask contains a pink liquid. In the center, a beaker holds a yellow liquid, and a smaller flask contains a blue liquid. To the right, a graduated cylinder is filled with an orange liquid, and another flask contains a white substance. The glassware is set against a light blue background with a white grid pattern.

Techniques d'analyse biochimique

**Enseignante :
YAKHLEF G.**

**L3 Microbiologie
2022/2023**



Chapitre III : Méthodes de désintégration cellulaire, extraction et fractionnement

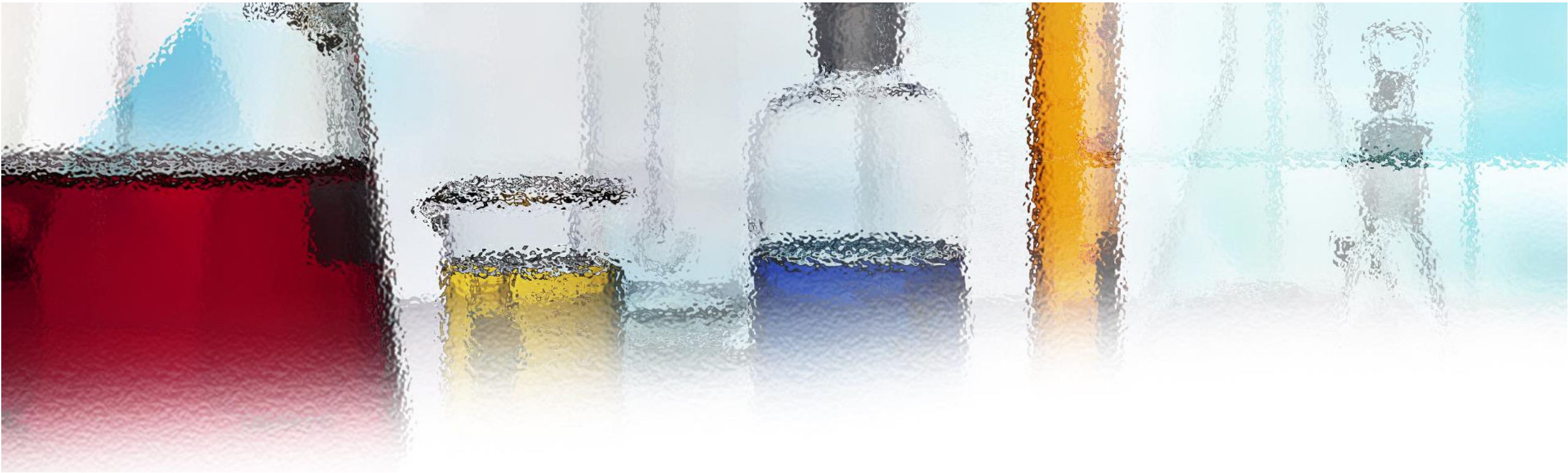
1) La désintégration cellulaire

2) La centrifugation

3) La filtration

4) La dialyse

5) Les méthodes d'extraction et de précipitation



1) LA DÉSINTÉGRATION CELLULAIRE

La désintégration cellulaire = Lyse cellulaire

- ❑ Etape initiale de la préparation de l'échantillon à analyser
- ❑ But: rompre la membrane plasmique ou la paroi (bactéries, champignons, cellules végétales) libérant les substances désirées.
- ❑ La lyse se fait dans un tampon de pH et force ionique connus.
- ❑ Le mélange des composantes cellulaires libérées dans le tampon (matériel biologique désintégré ou lysé) est appelé **lysat** (ou homogénat).



La désintégration cellulaire = Lyse cellulaire

DÉSINTÉGRATION CELLULAIRE

Méthodes
physiques

Méthodes
chimiques



a) Méthodes physiques

a.1) Broyeurs mécaniques



Homogénéisateur de type
Dounce

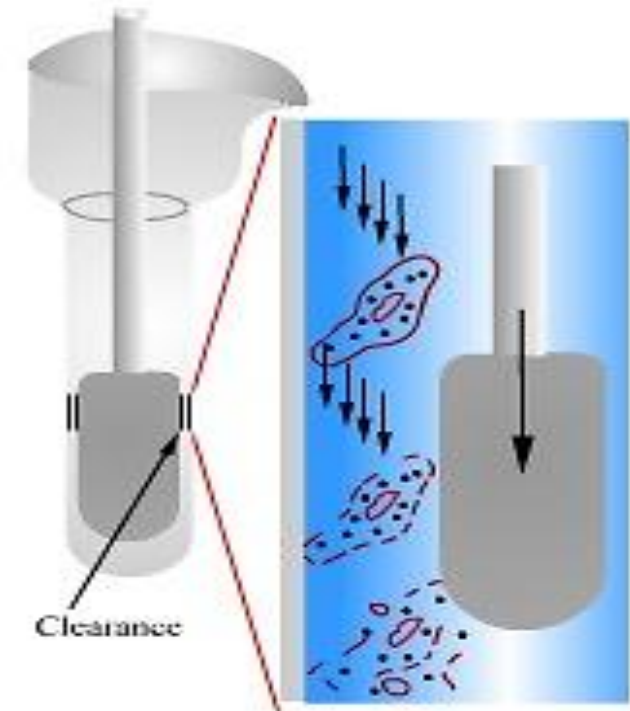


Homogénéisateur de type
Potter-Elvehjem

a) Méthodes physiques

a.1) Broyeurs mécaniques

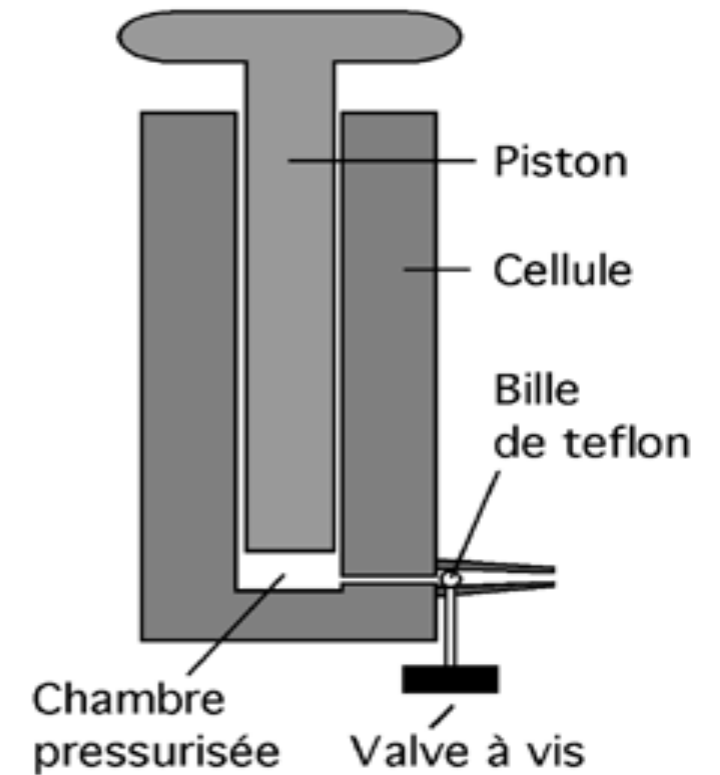
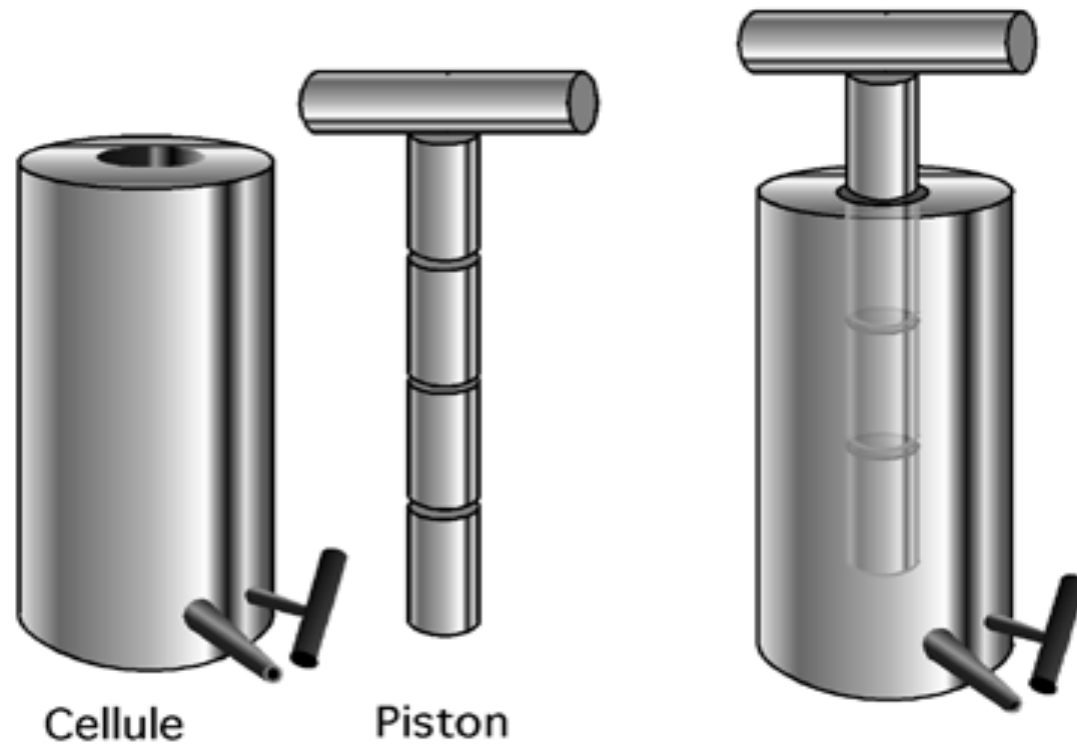
Broyeurs mécaniques en verre



Action des broyeurs mécaniques

a) Méthodes physiques

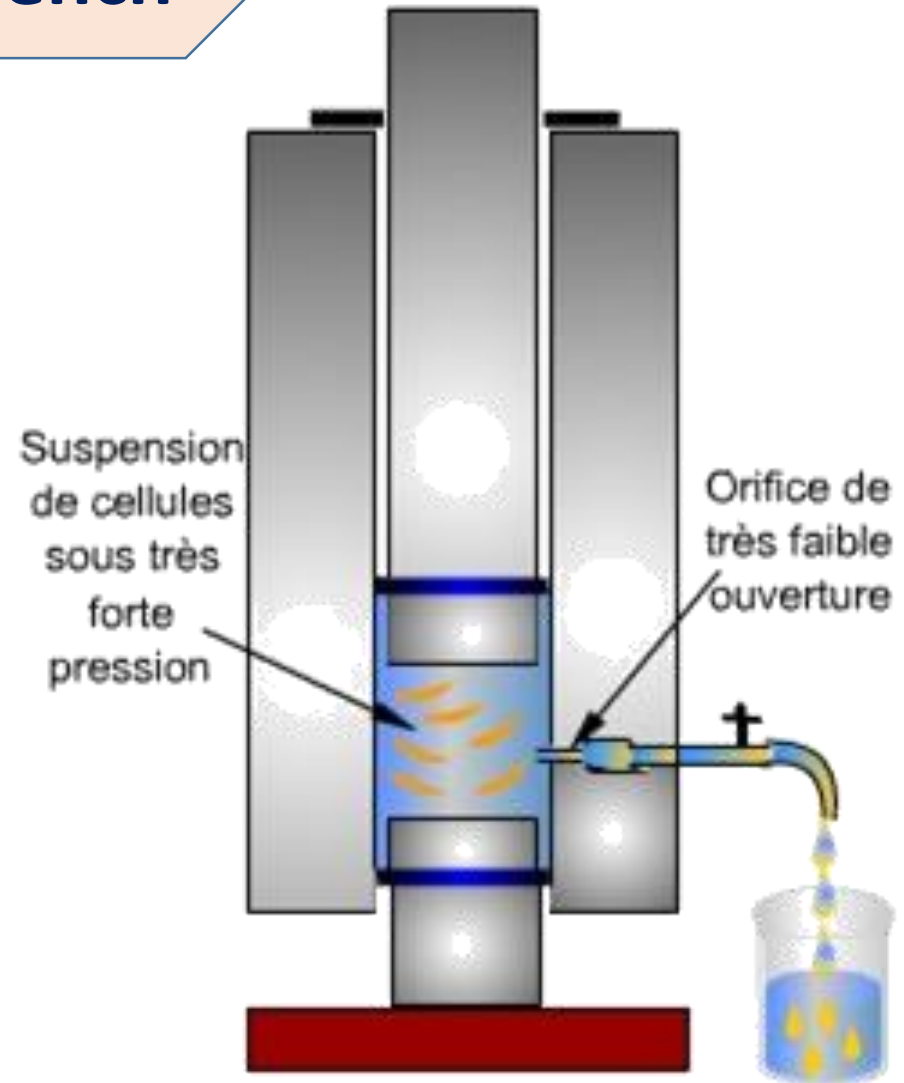
a.2) La presse Aminco-French



a) Méthodes physiques

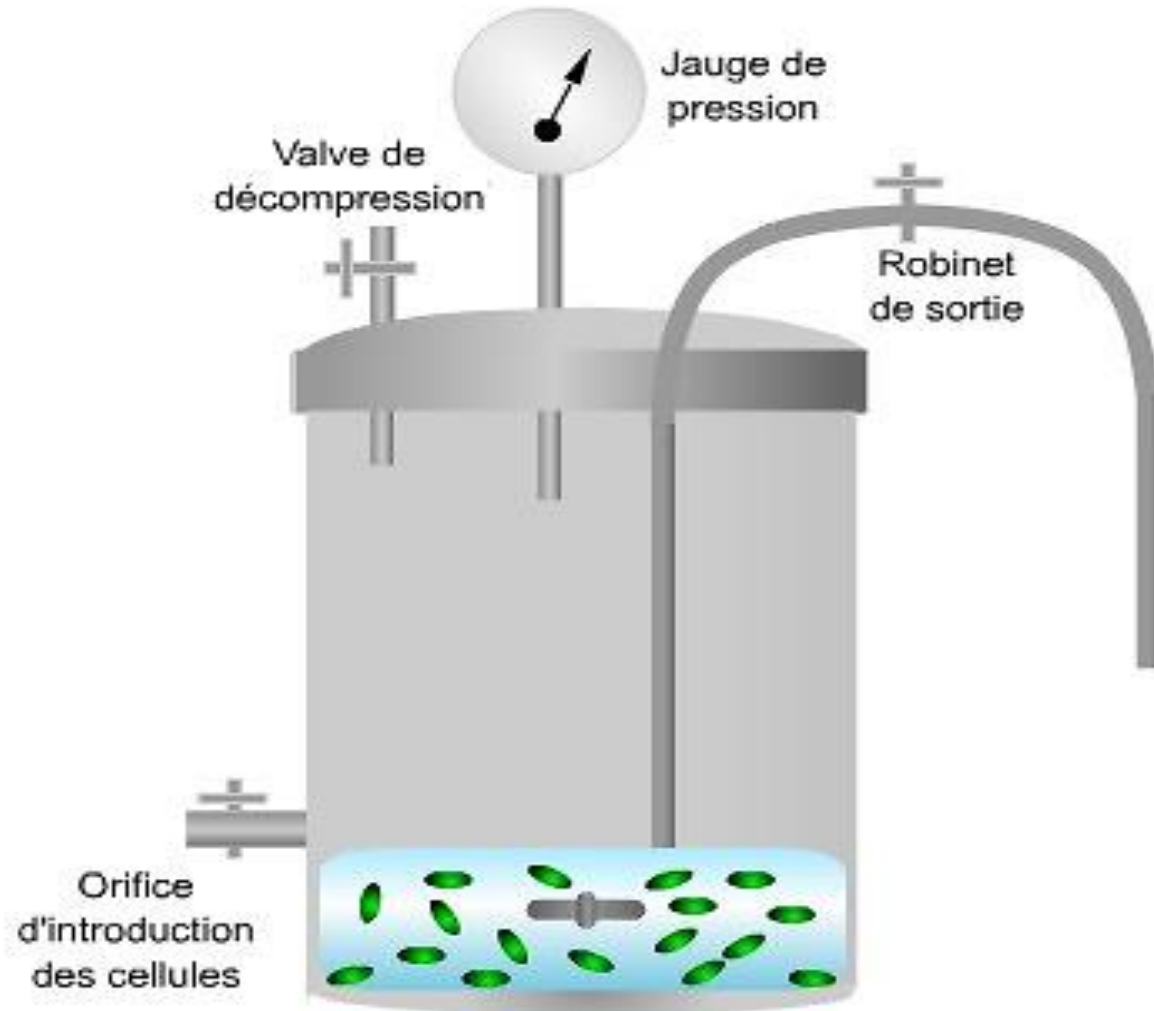
a.2) La presse Aminco-French

Action de la la presse
Aminco-French



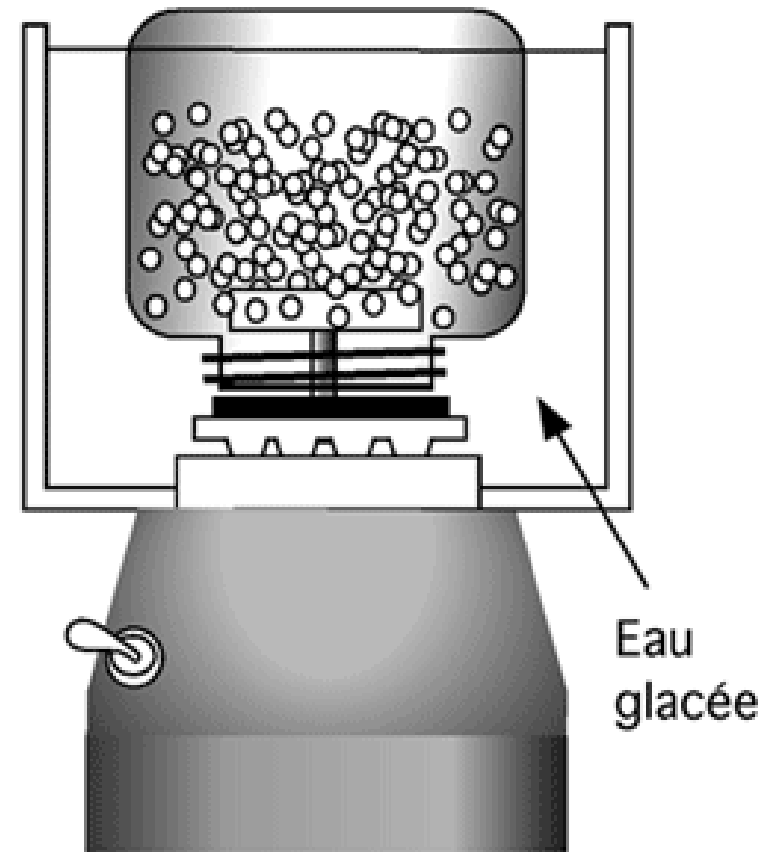
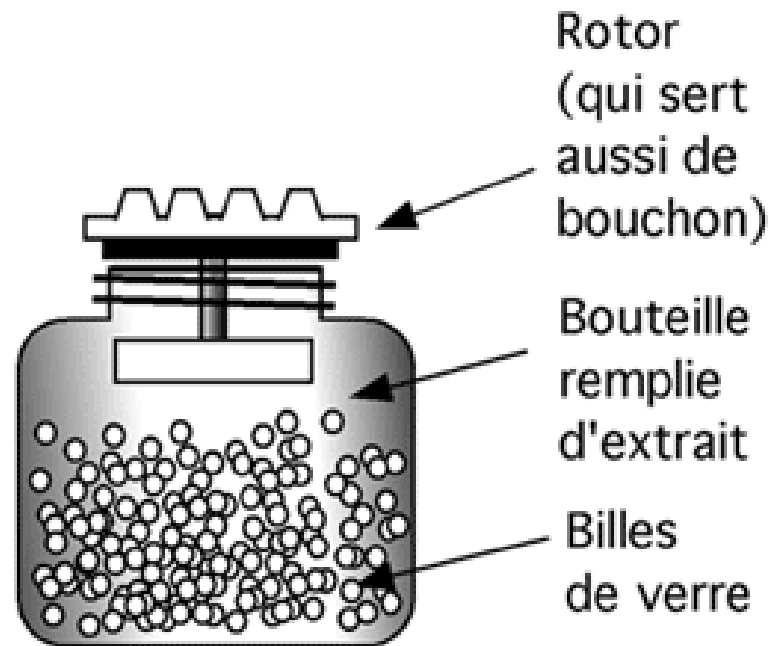
a) Méthodes physiques

a.3) Homogénéisateurs à gaz ou la bombe à disruption



a) Méthodes physiques

a.4) Les billes de verre

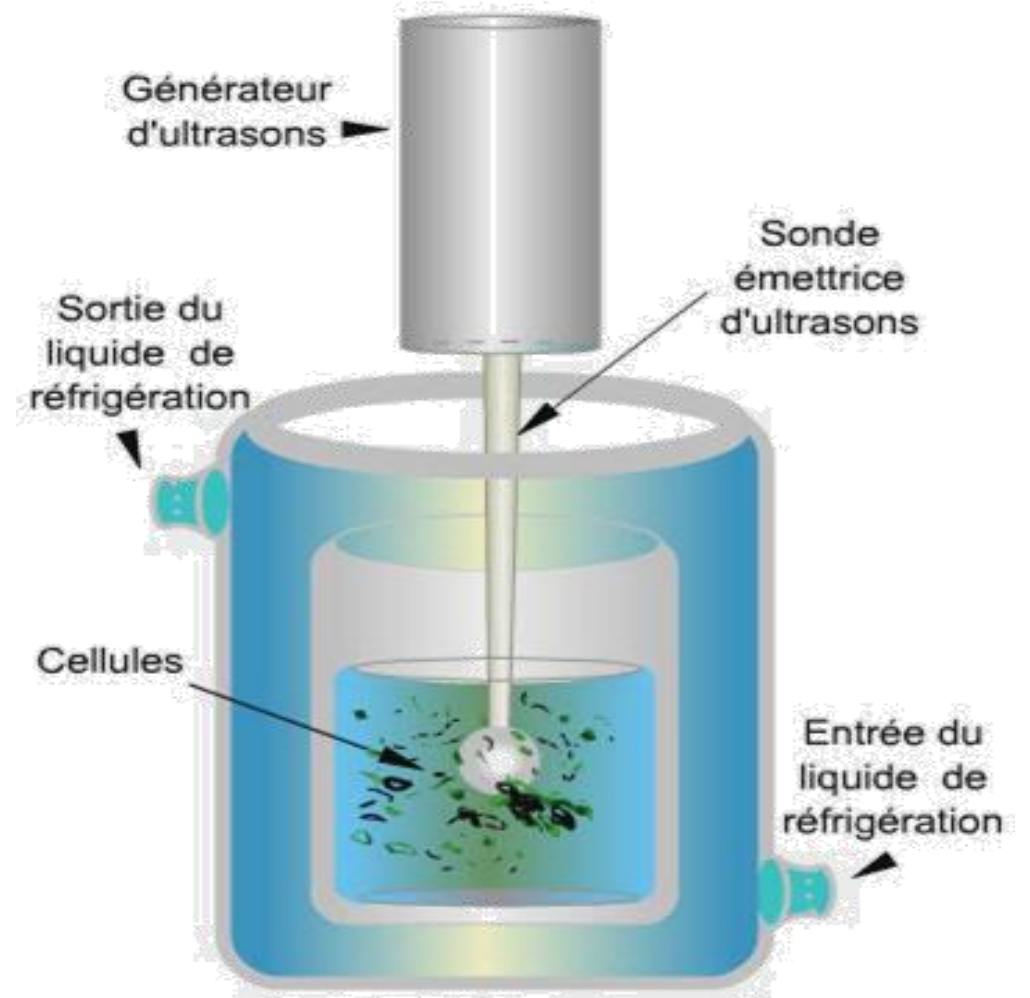


a) Méthodes physiques

a.5) La sonication



Sonicateur



dispositif du sonicateur

b) Méthodes chimiques

b.1) Lyse ou choc osmotique

b.2) Lyse enzymatique

b.3) Modification de la force ionique, du pH

b.4) Utilisation de détergents





Chapitre III : Méthodes de désintégration cellulaire, extraction et fractionnement

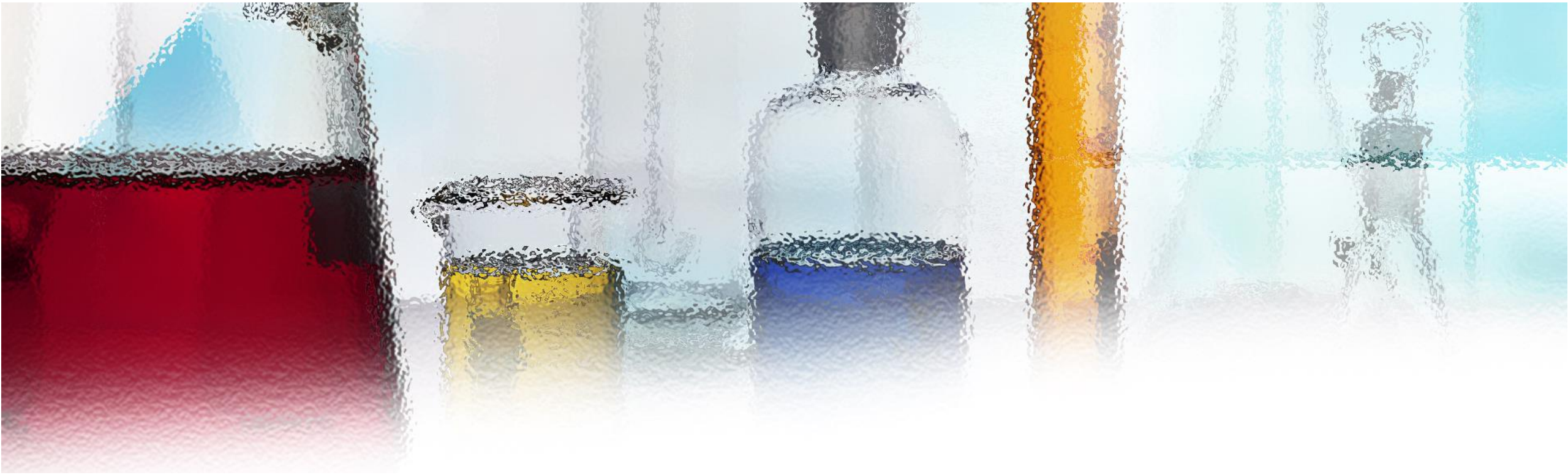
1) La désintégration cellulaire

2) La centrifugation

3) La filtration

4) La dialyse

5) Les méthodes d'extraction et de précipitation



2) LE CENTRIFUGATION

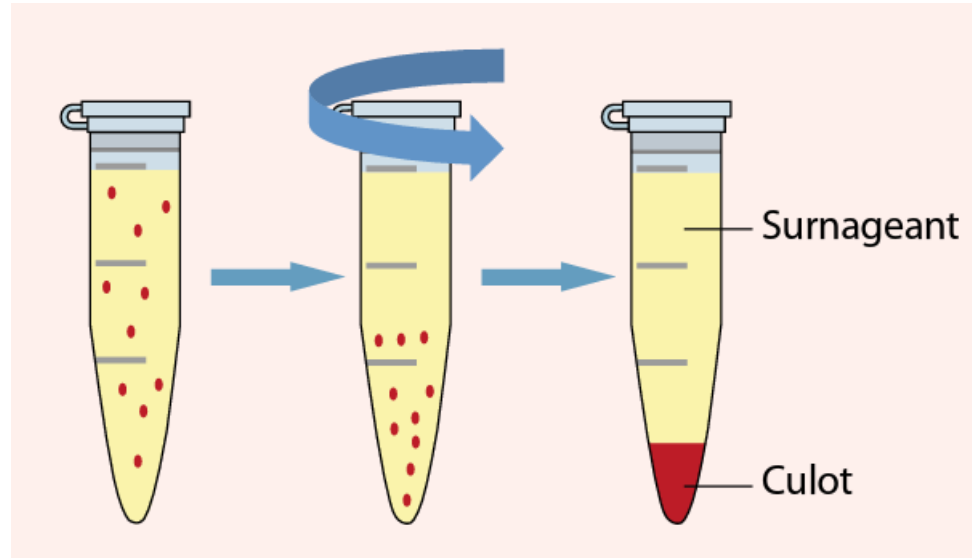
La centrifugation

La centrifugation est une technique de séparation de phases (phases liquides non miscibles ou phase solide suspendue dans une phase liquide) soumises à la force centrifuge, en fonction de leur densité.

- ❑ La force centrifuge est créée par la rotation rapide d'un rotor, entraîné par un moteur électrique.
- ❑ La vitesse de rotation peut aller de 100 à 100 000 rpm (*Revolutions Per Minute*).
- ❑ La taille de la centrifugeuse dépend de la taille et/ou du nombre des échantillons.



La centrifugation

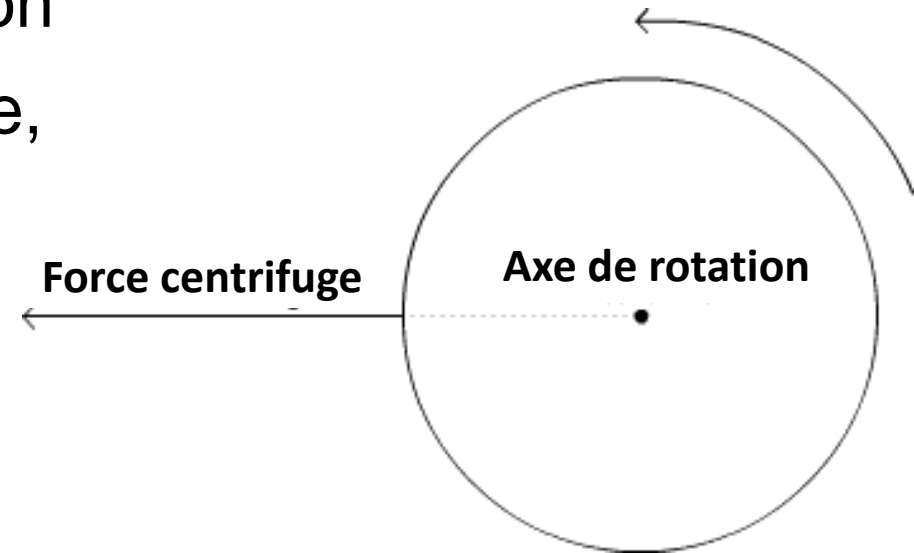


Les applications de centrifugation sont nombreuses et peuvent comprendre :

- la sédimentation de cellules et de virus,
- la séparation d'organelles sub-cellulaires,
- l'isolation de macromolécules comme l'ADN, l'ARN, les protéines et les lipides.

La centrifugation : principe

- ❑ Les constituants contenus dans un échantillon sont soumis à 2 forces : **La gravité** (↓) + **La poussé d'Archimède** (↑)
- ❑ En faisant tourner l'échantillon, on fait apparaître une nouvelle force, **la force centrifuge**, qui est une accélération qui s'exerce radialement vers l'extérieur de l'axe de rotation



$$F = M\omega^2 r$$

M: la masse de la particule

ω^2 : la vitesse angulaire en radian/sec

r: le rayon de la particule

La centrifugation : principe

- La force appliquée aux particules (par comparaison à la gravité) s'appelle **la force centrifuge relative** (RCF).
(Par exemple, une FCR de 500 x g signifie que la force centrifuge appliquée est 500 fois plus importante que la force gravitationnelle terrestre).

$$\text{RCF} = \frac{f_c}{f_g} = \frac{M\omega^2 r}{Mg} = \omega^2 r \times g^{-1}$$

$$= \frac{\left(\frac{2\pi}{60}\right)^2}{9,806\ 65} \times N^2 \times r$$

$$\approx 11,18 \times 10^{-6} \times N^2 \text{ (tr/min)} \times r \text{ (cm)}$$

r est le rayon horizontal effectif depuis le centre du rotor jusqu'au bout inférieur du tube (cm), N est la vitesse de rotation (tr/min).

Types de centrifugeuses

Types de centrifugeuses



Les centrifugeuses diffèrent principalement par :

- La **vitesse** maximale à laquelle l'échantillon est soumis afin d'effectuer une sédimentation des particules d'intérêt
- La présence/absence de **vide**
- Le contrôle ou pas de **température** durant la centrifugation
- La capacité de la centrifugeuse (**volume** maximal d'échantillon/tube individuel de centrifugation)

Types de centrifugeuses : selon la vitesse

1) Les centrifugeuses à vitesse faible

- Utilisées en routine dans la sédimentation des particules lourdes
- Vitesse max: 4000 à 5000 rpm
- Fonctionnent souvent à T° ambiante (ne sont pas réfrigérées)

2) Les centrifugeuses à haute vitesse

- Vitesse max: 15 000 à 20 000 rpm
- Le contrôle de la T° est nécessaire : Centrifugeuses réfrigérées

3) Les Ultra-centrifugeuses

- La plus sophistiquée des centrifugeuses
- Vitesse max: 65 000 rpm (150 000 rpm \approx 1 000 000 g dans les modèles les plus récents)
- Centrifugeuses réfrigérées + Sous vide
- Utilisées à des fins préparatives ou analytiques

Types de centrifugeuses

- ❑ Ultracentrifugeuse
 - permettent d'atteindre des accélérations très élevées (jusqu'à 65 000 rpm)
 - Tous les modèles sont réfrigérés
 - La centrifugation s'effectue sous vide



Types de centrifugeuses : selon la capacité



Micro-centrifugeuse

Centrifugeuse de paillasse
(T° ambiante)

Vitesse max : 5500 rpm

Capacité max : 1,5 à 2 ml/Tube



Micro-centrifugeuse (Thermostatée)

Vitesse max : 15000rpm

Capacité max : 1,5 à 2 ml/Tube



Centrifugeuse à haute capacité (Thermostatée)

Vitesse max : 13500 rpm

Capacité max : 500 ml/Tube



Rotors



Godets d'adaptation



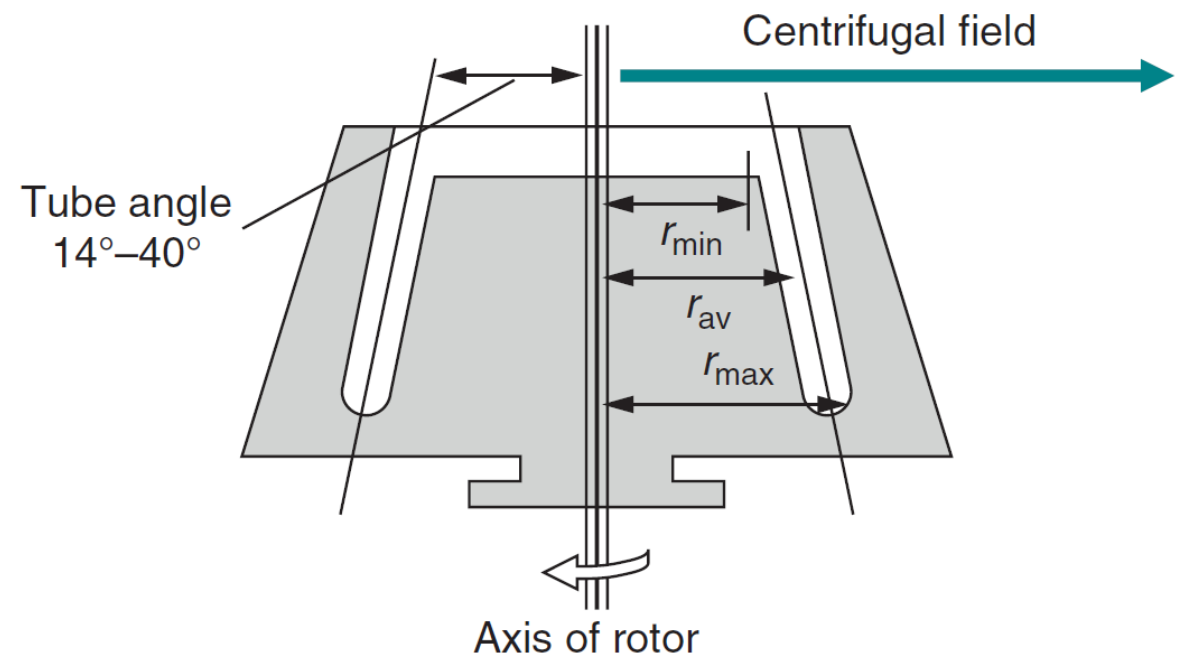
Il est important d'équilibrer les tubes dans la centrifugeuse pour que la rotation soit centrée autour du rotor.

Un mauvais équilibrage du rotor peut au mieux entraîner une mauvaise séparation des phases du mélange, dans le pire des cas, casser la centrifugeuse (désaxage du rotor).

Types de rotors

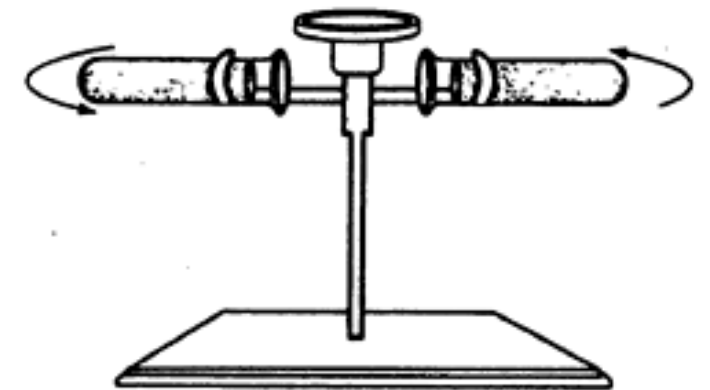
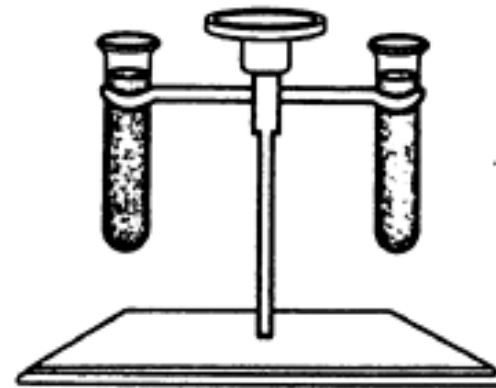
Types de rotors

1) Rotors angulaires



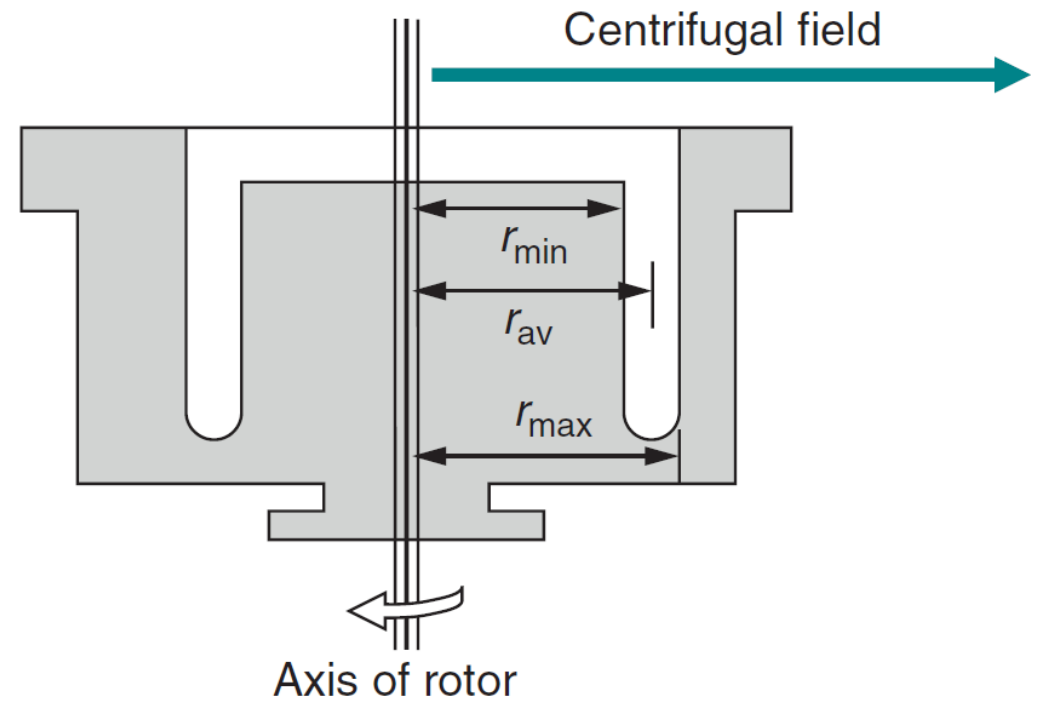
Types de rotors

2) Rotors libres



Types de rotors

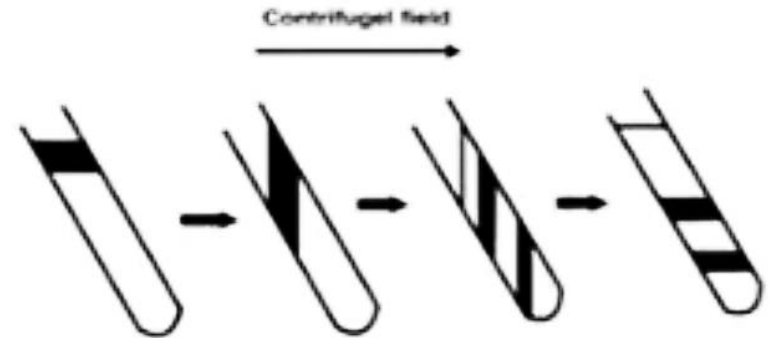
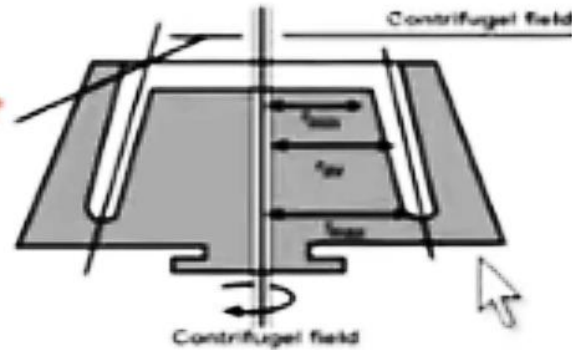
3) Rotors verticaux



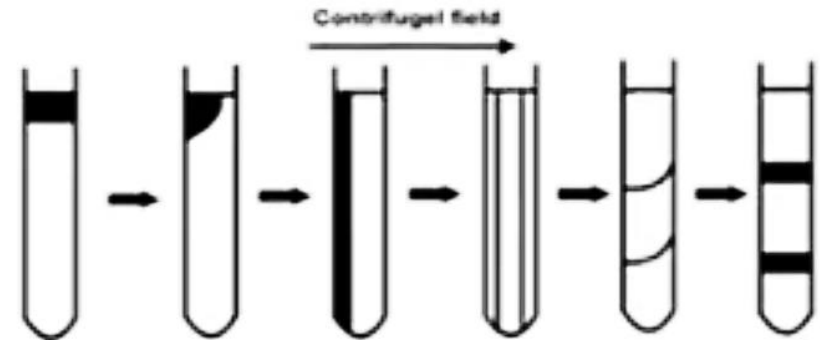
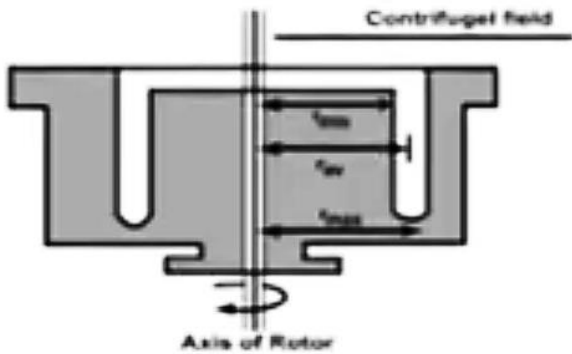
Types de rotors

■ Fixed Angle Rotor

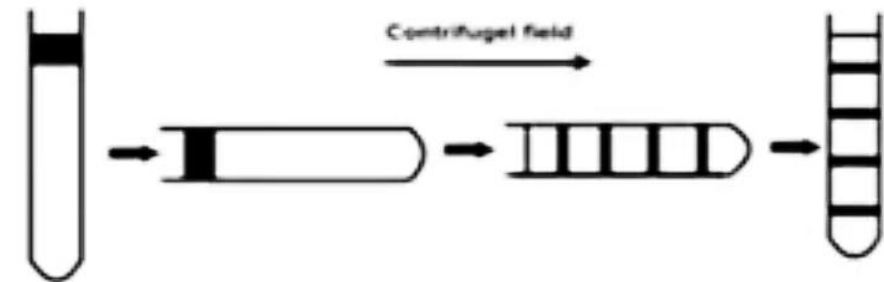
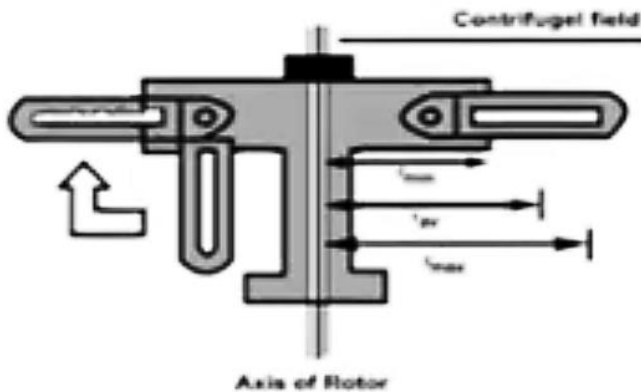
be angle
14°-45°



■ Vertical Tube Rotor



■ Swinging Bucket Rotor



Types de centrifugations

Types de centrifugation

1) La centrifugation différentielle

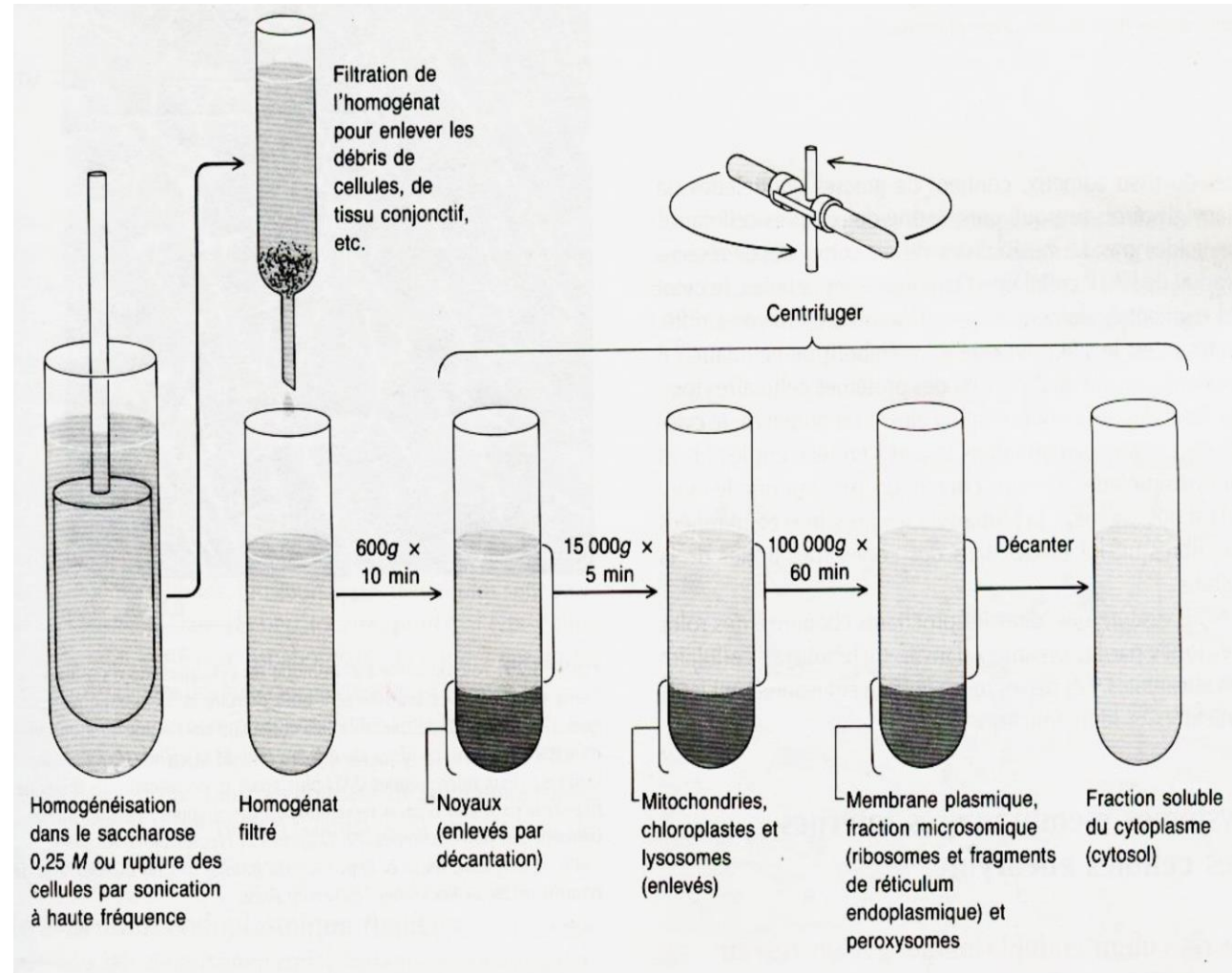
- la séparation s'effectue principalement selon la taille des particules.
- Utilisé couramment pour la récupération de culots et l'obtention de préparations partiellement pures d'organelles subcellulaires et de macromolécules.

Conditions de sédimentation de quelques constituants cellulaires.

| Constituants cellulaires | Conditions de sédimentation |
|--|------------------------------------|
| Noyau | 10 minutes à 500 g |
| Mitochondries, lysosomes, peroxysomes | 10 minutes à 5000 g |
| Réticulum endoplasmique, appareil de Golgi | 1 heure à 100000 g |

Types de centrifugation

1) La centrifugation différentielle



Isolement des organites cellulaires.

Types de centrifugation

2) La centrifugation en gradient de densité

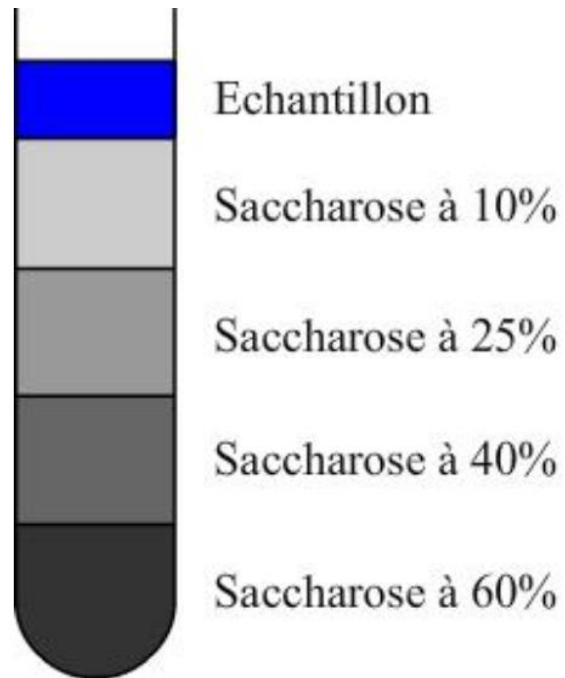
- Les particules sédimentent au sein d'un gradient de densité.
- A l'équilibre, chaque particule se stabilise dans la zone du gradient où la densité est égale à la sienne.
- Si la densité de la particule est plus grande que celle du milieu, elle sédimentera. Plus la différence de densité est grande plus la sédimentation est rapide.
- S'il n'y a aucune différence de densité, il n'y aura aucune sédimentation, quelle que soit l'accélération.
- Si la particule est moins dense que le milieu, celle-ci s'élèvera dans le tube jusqu'à atteindre un niveau de densité égal à la sienne.
- **Applications** : principalement dans la purification des virus, des plasmides, des ribosomes et des membranes.

Types de centrifugation

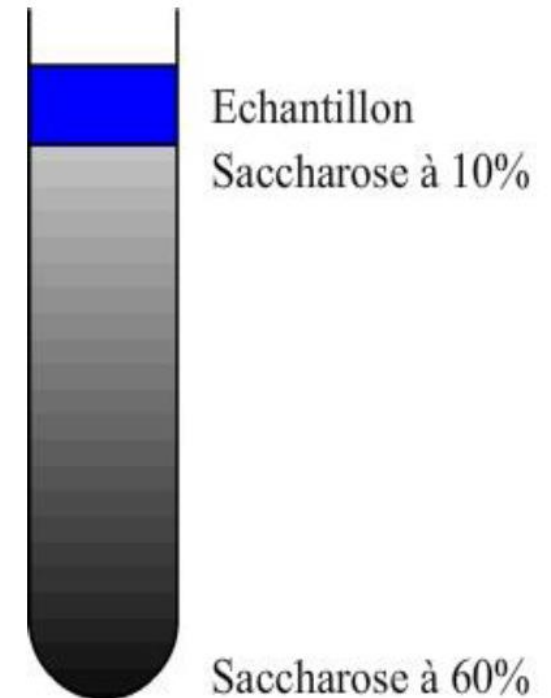
2) La centrifugation en gradient de densité

➤ Il existe 2 types de gradients de densité:

1) Les gradients discontinus



2) Les gradients continus



Types de centrifugation

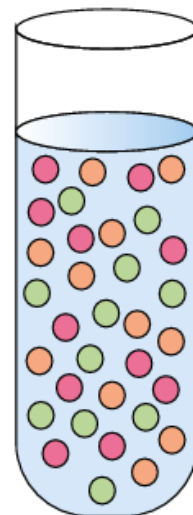
2) La centrifugation en gradient de densité

2.1) Ultracentrifugation

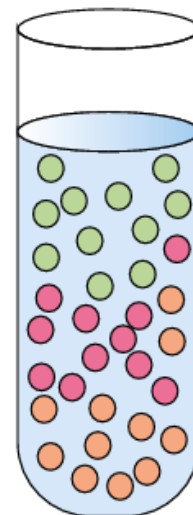
isopycnique :

- L'échantillon est placé dans le tube avec le milieu de densité (ex. Chlorure de césium)
- Sous l'influence de la force centrifuge, le chlorure de césium se distribue pour former un gradient continu de densité
- Les particules de l'échantillon se déplacent dans le tube et s'arrêtent lorsqu'elles atteignent le niveau de densité égal à la leur

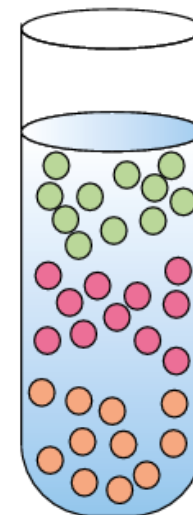
Centrifugation



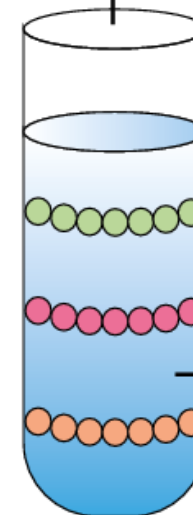
0



2



4



8 h

Les particules se distribuent selon leur densité

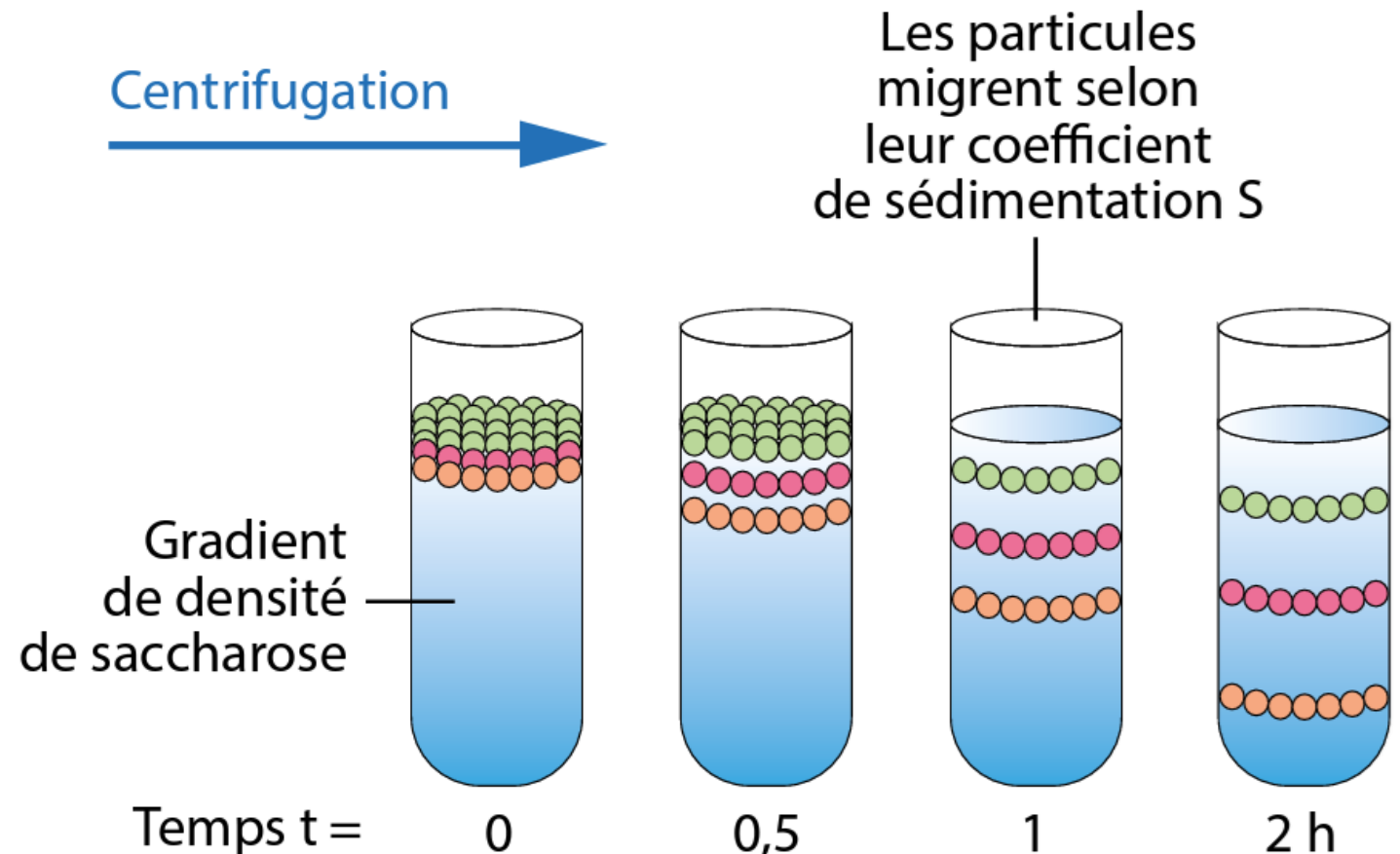
Gradient de densité de CsCl

Types de centrifugation

2) La centrifugation en gradient de densité

2.2) Ultracentrifugation de zone:

- Un gradient de densité est créé dans un tube (ex. gradient de saccharose)
- L'échantillon est déposé sur un milieu (en haut du tube)
- La séparation des constituants se fait selon leurs coefficients de sédimentation (les particules les plus denses se déplacent plus rapidement que les moins denses)



L'ultracentrifugation

L'ultracentrifugation

1) Préparative

- Utilisée dans la séparation de petites particules telles que les virus, les protéines, l'ARN et l'ADN plasmidique.
- Peut être appliquée sans ou avec un gradient de densité

2) Analytique

- Utilisée dans la détermination des propriétés physiques des particules sédimentées (poids moléculaire, densité, coefficient de sédimentation ...)
- Utilisées avec un gradient de densité
- Un système de détection optique est fourni avec la centrifugeuse analytique pour surveiller la rotation de l'échantillon en temps réel.





Chapitre III : Méthodes de désintégration cellulaire, extraction et fractionnement

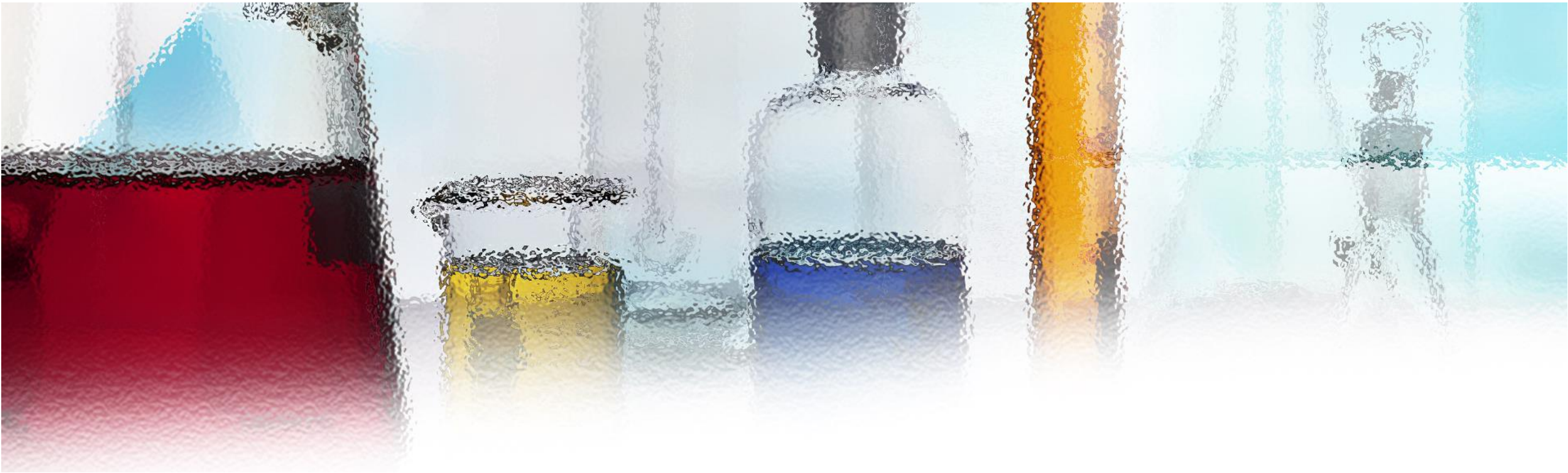
1) La désintégration cellulaire

2) La centrifugation

3) La filtration

4) La dialyse

5) Les méthodes d'extraction et de précipitation



3) LA FILTRATION

La filtration

la filtration est une technique qui permet de séparer un solide d'un liquide à l'aide d'une membrane de filtration.

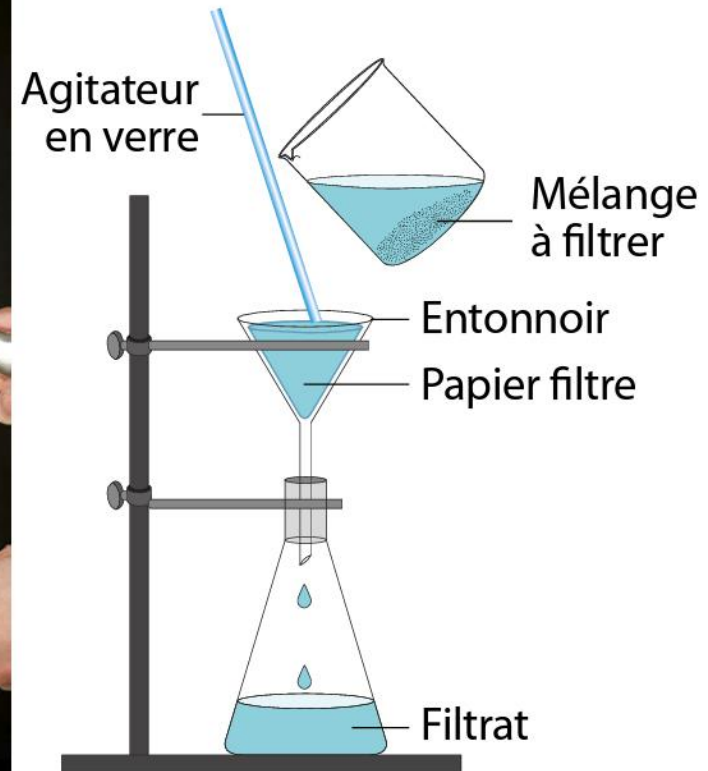
La solution obtenue après filtration est appelée **filtrat** (ou perméat) et le solide retenu est le **retentat** (ou gâteau).



La filtration

► Filtration par gravité

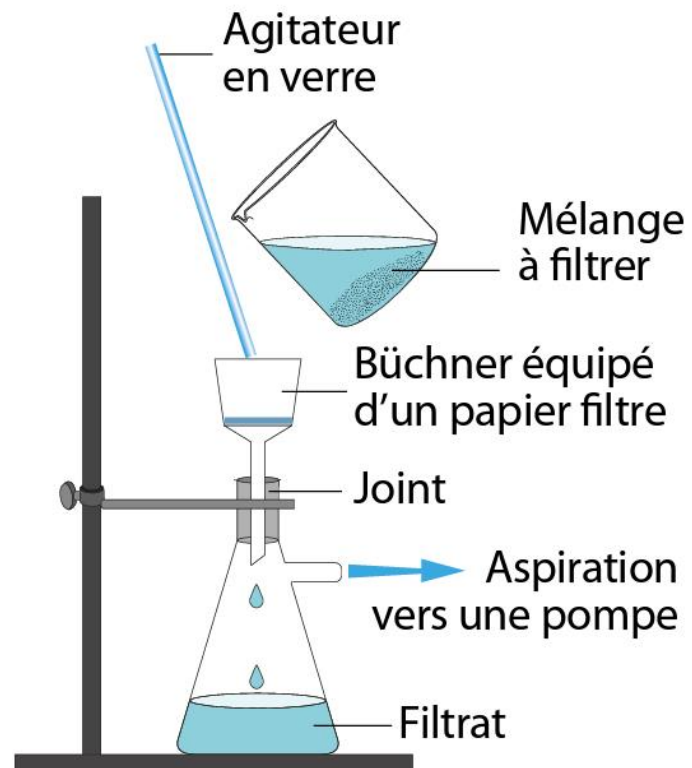
Le liquide s'écoule librement au travers d'un simple filtre (généralement en papier).



La filtration

► Filtration sous vide

Le liquide est « aspiré » par le vide au travers de la membrane (entonnoir Büchner équipé d'un papier filtre ou entonnoir fritté).



La filtration

▶ Nature des membranes

Les membranes peuvent être de différentes matières : cellulose, téflon, PVC, polyamide... Elles sont choisies selon les produits/solutions à filtrer.



Entonnoir Büchner



Papier filtre

▶ Entonnoirs frittés

Il existe plusieurs porosités de fritté (graduées de 0 à 5). Plus le chiffre est grand, plus la taille des pores du fritté est petite et par conséquent, plus le solide retenu sera fin.



Entonnoirs frittés



Autres applications de la filtration

Filtration stérilisante (ultrafiltration)

L'ultrafiltration permet d'éliminer les microorganismes d'un fluide (liquide ou gaz) à l'aide de « filtres microbiens » qui ont une porosité maximale de $0,22 \mu\text{m}$ (membranes en polyéther-sulfone, polypropylène ou polyamide).

Application

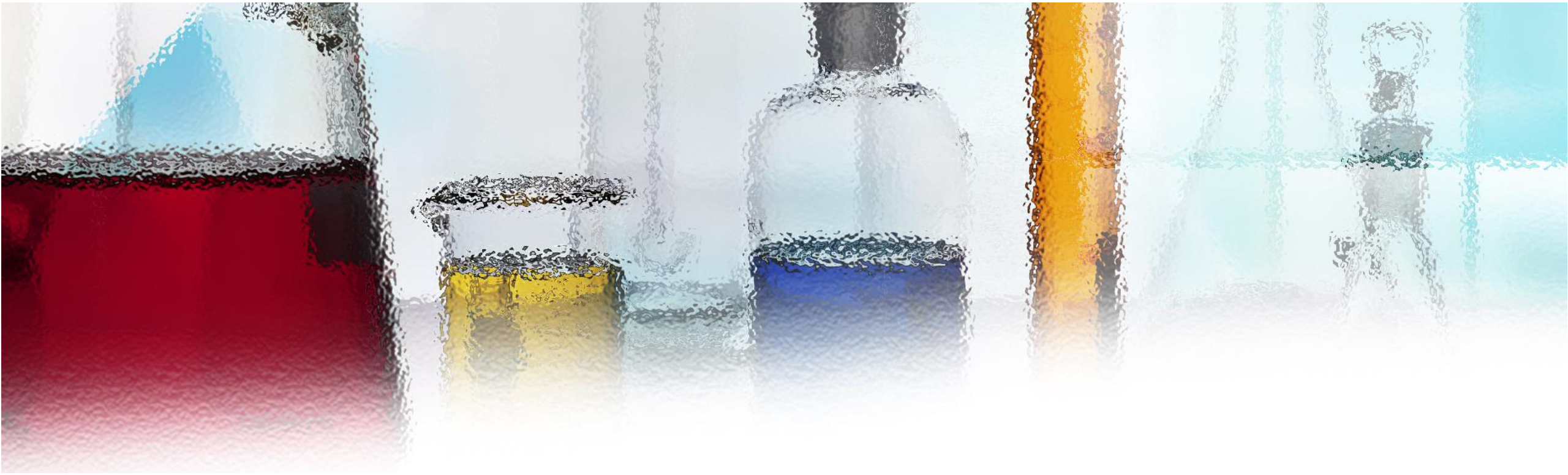
Stérilisation de solutions injectables ne pouvant être stérilisées par la chaleur (ex : vaccins).





Chapitre III : Méthodes de désintégration cellulaire, extraction et fractionnement

- 1) La désintégration cellulaire
- 2) La centrifugation
- 3) La filtration
- 4) La dialyse
- 5) Les méthodes d'extraction et de précipitation



4) LA DIALYSE

La dialyse

La dialyse permet la séparation de composés ou d'ions à travers une membrane perméable ou semi-perméable.

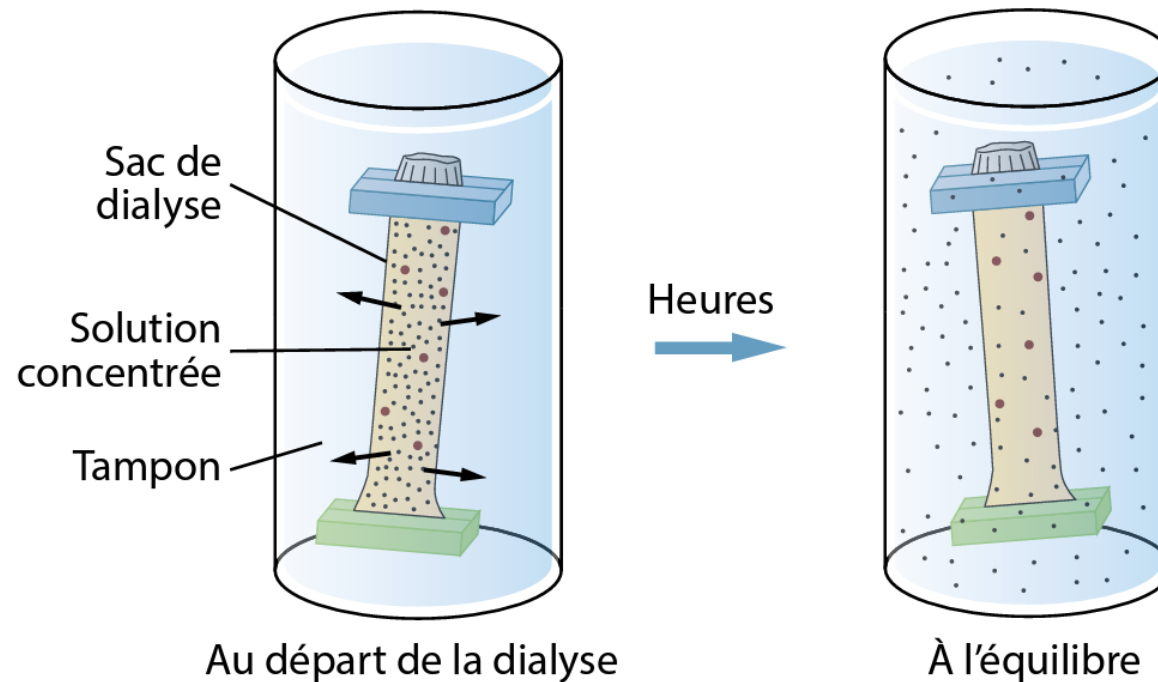
❑ Deux phénomènes interviennent dans la dialyse :

1) La diffusion : les molécules migrent à travers la membrane du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré jusqu'à atteindre un équilibre.

2) L'exclusion stérique : la membrane sert de filtre. Seules les molécules les plus petites peuvent traverser la membrane



La dialyse



Dialyse d'une protéine

- ❑ Une fois l'équilibre de concentration est atteint, il faut changer le tampon de dialyse (à plusieurs reprises).
- ❑ A la fin de la dialyse, l'échantillon contenu dans le sac de dialyse est récupéré, et concentré (souvent à l'aide du PEG)

La membrane (tube) de dialyse



- Nature de la membrane : Cellulose
- MWCO (molecular weight cut-off) : 1 - 50 kD

Applications de la dialyse

1. Dessalage
2. Changement de tampons
3. Concentration des solutions





Chapitre III : Méthodes de désintégration cellulaire, extraction et fractionnement

- 1) La désintégration cellulaire
- 2) La centrifugation
- 3) La filtration
- 4) La dialyse
- 5) Les méthodes d'extraction et de précipitation



5) MÉTHODES D'EXTRACTION ET DE PRÉCIPITATION

Applications aux protéines et acides nucléiques



Extraction par solvant

L'extraction : Définition et principe

Définition : Une extraction consiste à retirer (extraire) une ou plusieurs espèces chimiques d'un milieu solide ou liquide.

Principe : L'extraction par solvant consiste à faire passer, par solubilisation, la substance à extraire dans un solvant (eau, solvant organique ... etc. selon la **polarité** de la substance à extraire)

Les espèces chimiques obtenues après extraction sont appelées "**extrait**"



L'extraction : Choix du solvant

- L' **espèce chimique** à extraire doit être **la plus soluble** possible dans le solvant
- Le **solvant** doit être le **moins dangereux** possible.
- Les solvants organiques utilisés pour l'extraction doivent être volatils pour pouvoir être éliminés facilement par évaporation (concentration des composés extraits avant analyse ou évaporation à sec du soluté isolé). L'eau peut être lyophilisée.



a) L'extraction Liquide-Liquide

a) Extraction Liquide-Liquide

Repose sur le **partage** d'un soluté entre deux phases liquides non-miscibles.

- Cette extraction est réalisée dans une ampoule à décanter
- Les deux phases liquides sont séparées en fonction de leur densité dans l'ampoule à décanter. La phase la plus dense se retrouve en bas de l'ampoule, la moins dense en haut



Ampoule à décanter



a) Extraction Liquide-Liquide

Densité et $T_{\text{éb.}}$ des solvants utilisés classiquement en extraction liquide - liquide

| Solvants | Densité | $T_{\text{éb.}}$ (°C) |
|------------------|---------|-----------------------|
| Acétate d'éthyle | 0,902 | 77 |
| Chloroforme | 1,492 | 61 |
| Dichlorométhane | 1,325 | 40 |
| Diéthyléther | 0,706 | 35 |
| Eau | 1 | 100 |

Données fournisseur Sigma-Aldrich



a) Extraction Liquide-Liquide

- ex. Extraction d'un ou plusieurs composés se trouvant dans une phase aqueuse, par un solvant organique

**Isolement de l'iode en solution aqueuse
par extraction au dichlorométhane (DCM)**

b) L'extraction Solide-Liquide

b) Extraction Solide-Liquide

Consiste à transférer des molécules d'une matière solide vers un liquide : Le liquide va solubiliser les molécules présentes dans le solide

- **Le solide** : échantillon (matériel biologique) contenant les substances à extraire
- **Le liquide** est un **solvant**. Le choix du solvant se fait principalement en fonction de la polarité de la molécule à extraire



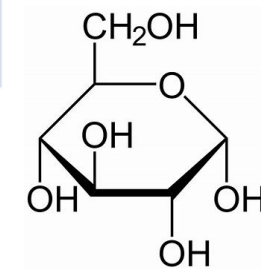
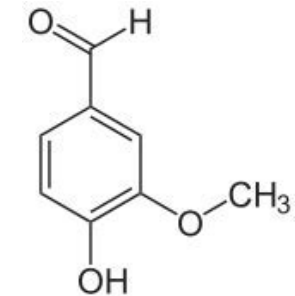
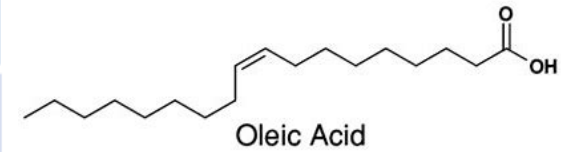
b) Extraction Solide-Liquide



Polarité



| Solvants | Exemples de molécules extraites |
|-------------|---------------------------------|
| hexane | acide oléique |
| chloroforme | vanilline |
| eau | glucose |



b) Extraction Solide-Liquide

Paramètres influençant l'extraction solide-liquide:

- 1) **Etat du solide** : plus le matériel biologique est broyé finement, plus la surface de contact avec le solvant augmente
- 2) **Température d'extraction** : Plus elle augmente plus le rendement d'extraction est élevé (attention aux molécules thermolabiles!)
- 3) **Rapport de masses liquide/solide** : Plus il est élevé plus la solvation est améliorée



b) Extraction Solide-Liquide

Différents types d'extraction solide-liquide:

Pour les molécules non volatiles

- Macération
- Infusion
- Décoction
- Digestion
- Lixiviation
- Appareil de Soxhlet
- Fluides pressurisés
- Micro-ondes
- Ultrasons

Pour les molécules volatiles

- Hydrodistillation
- Distillation sèche
- Enfleurage
- Expression
- Extraction par solvants volatils



Macération

Le principe

La macération est une technique d'**extraction solide-liquide** qui se déroule à **température ambiante**.

Elle consiste à mettre en contact une matière première (MP) avec un solvant afin d'extraire les molécules de la MP qui sont solubles dans ce solvant.



⇒ La macération assure la préservation des composés thermolabiles

La macération peut durer de **quelques heures à plusieurs jours**. Plus le temps de macération est long, plus le rendement d'extraction est important (jusqu'à un certain seuil).

Après macération, le reste du solide (**marc**) est séparé du liquide (**macérât**) par filtration, ou par centrifugation si la poudre de la matière première est très fine

Infusion

Le principe

L'infusion est une technique d'**extraction solide-liquide** qui consiste à faire chauffer le solvant jusqu'à sa **température d'ébullition**, puis à le verser sur la matière première à extraire. L'extraction se déroule à **température décroissante**.



L'infusion se fait fréquemment avec l'eau mais elle peut être réalisée avec tous les solvants

Après **filtration**, l'**infusé** est obtenu. Il contient le solvant et les molécules extraites.
Le **marc** constitue la matière première épuisée qui reste dans le filtre.



- Grâce à la **température élevée**, l'infusion permet d'obtenir un **meilleur rendement** d'extraction par rapport à la macération
- L'infusion n'est pas adaptée à l'extraction des molécules thermolabiles

Décoction

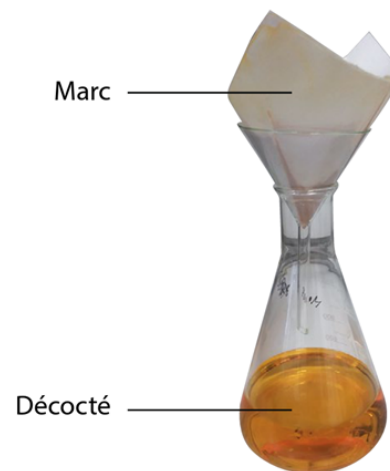
Le principe

La décoction est une technique d'**extraction solide-liquide** qui consiste à mettre en contact la matière première (MP) avec le solvant. Le tout est chauffé jusqu'à la **température d'ébullition** ($T_{éb.}$) du solvant. L'extraction se déroule à température croissante puis **constante**.



Après **filtration**, le **décocté**, est obtenu. Il contient le solvant et les molécules extraites. Le marc constitue la MP épuisée qui reste dans le filtre.

La décoction s'applique généralement aux parties les plus coriaces des végétaux (écorces, graines, racines...) ou autres matières premières. Tous les solvants sont utilisables.



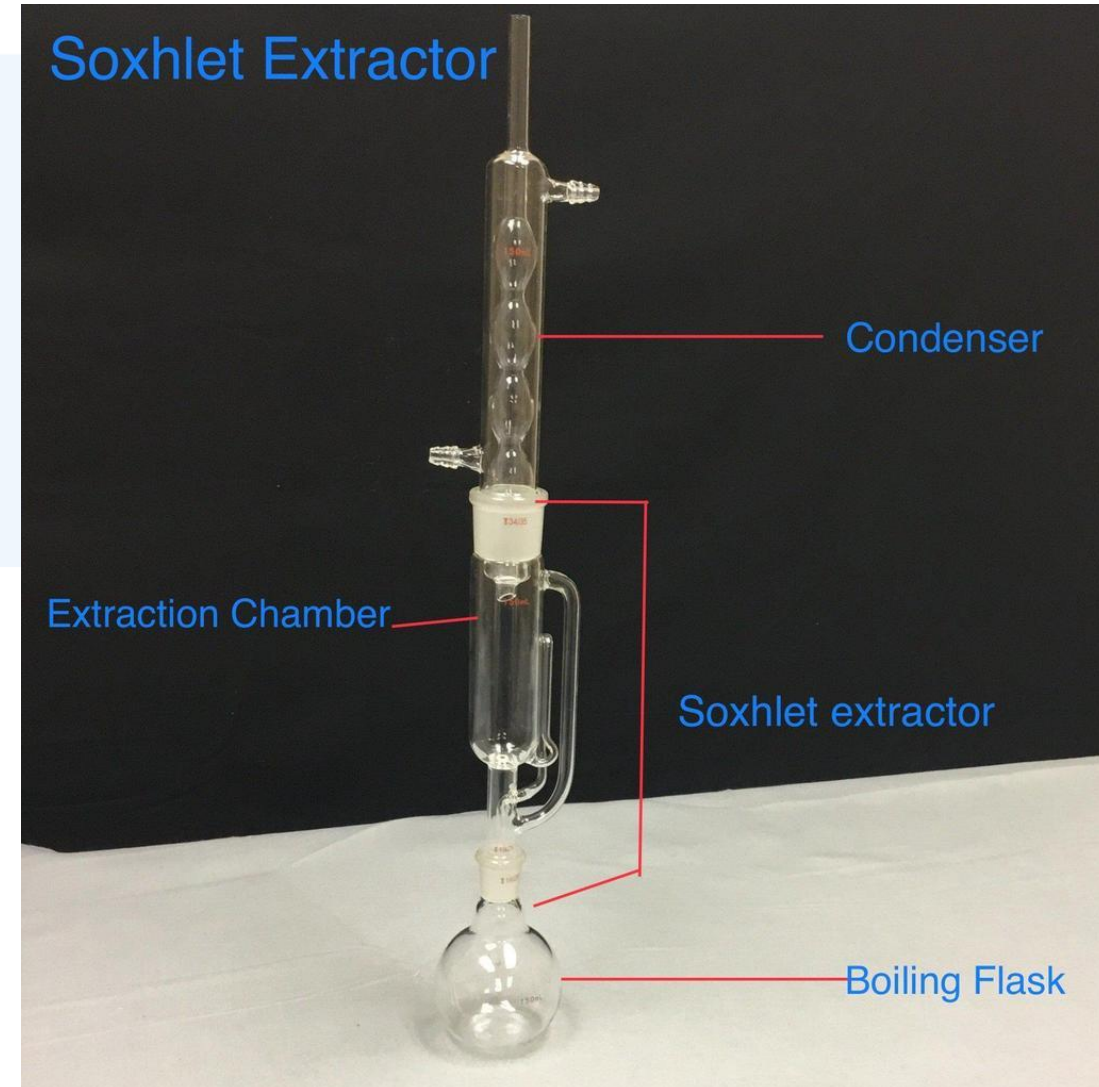
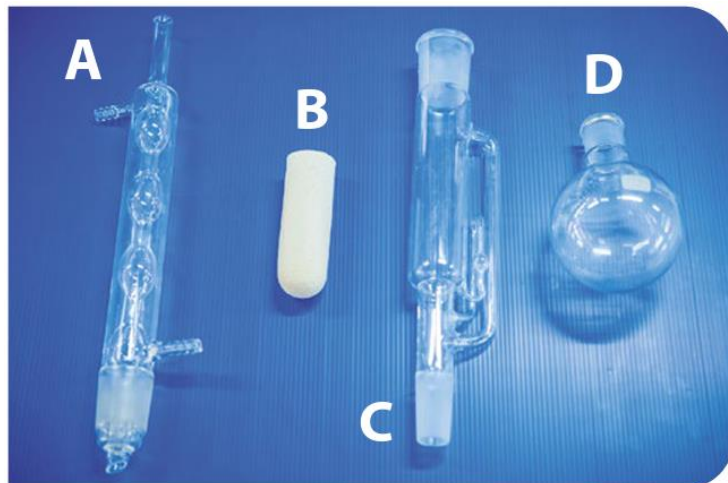
- Grâce à la **température élevée**, La décoction permet d'obtenir un **meilleur rendement** d'extraction par rapport à la macération
- La décoction n'est pas adaptée à l'extraction des molécules thermolabiles

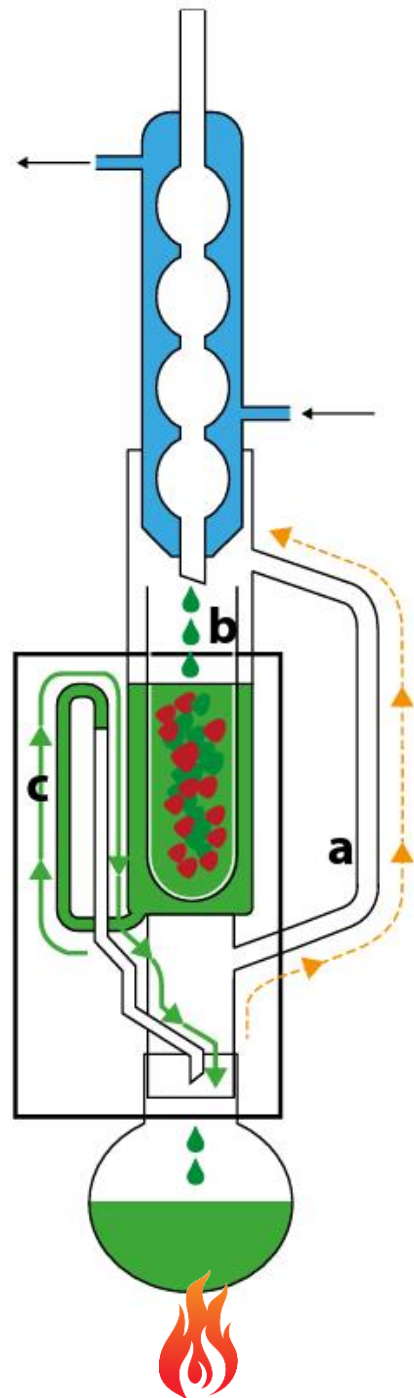
Extraction par appareil de Soxhlet

▶ Le principe

L'extraction par appareil de **Soxhlet** est une technique d'**extraction solide-liquide** qui consiste à faire circuler un solvant en continu à travers la matière première (MP). C'est une technique d'**extraction continue**.

Pour cela, il faut utiliser un **extracteur de Soxhlet** ou **appareil de Soxhlet (C)**, un ballon (**D**), un réfrigérant (**A**) et une cartouche poreuse (**B**).





- **Avantage** : Technique économique: Peu de solvant est utilisé puisqu'il est recyclé (il n'est jamais saturé car il est distillé au continu)
- **Inconvénient** : Ne convient pas aux molécules thermolabiles.

Hydrodistillation

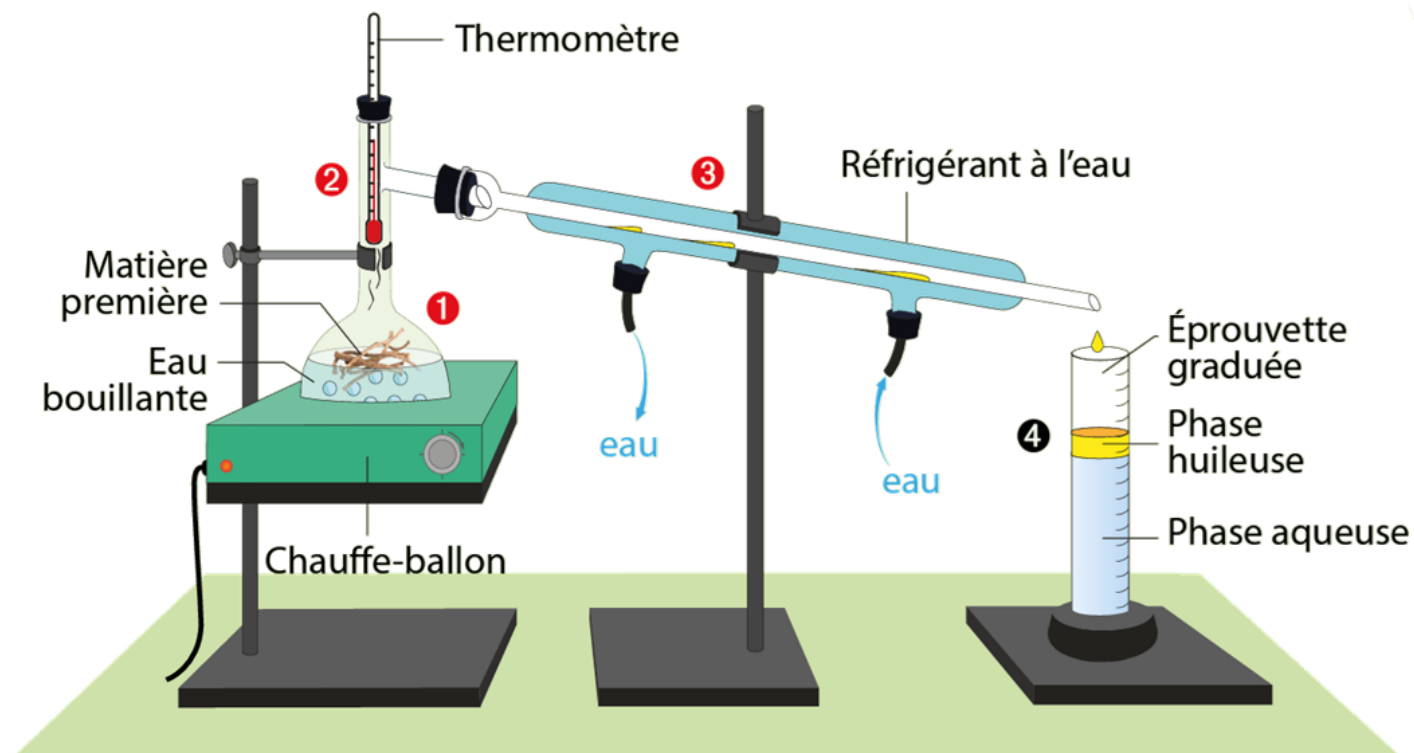
Le principe

L'hydrodistillation est une technique d'extraction de **molécules volatiles**.

Le solvant utilisé est l'**eau**.

En chauffant le mélange matière première (MP) à extraire + eau, on forme un **mélange hétéroazéotro-pique**. Ainsi on obtient une vapeur constituée des différentes molécules volatiles + eau qui sera ensuite recondensée sous forme de deux liquides non miscibles.

- 1 MP + eau chauffée
- 2 eau + molécules volatiles sous forme vapeur
- 3 vapeur recondensée
- 4 deux phases liquides non miscibles :
 - une phase huileuse = **huile essentielle** ;
 - une phase aqueuse = **hydrolat**.

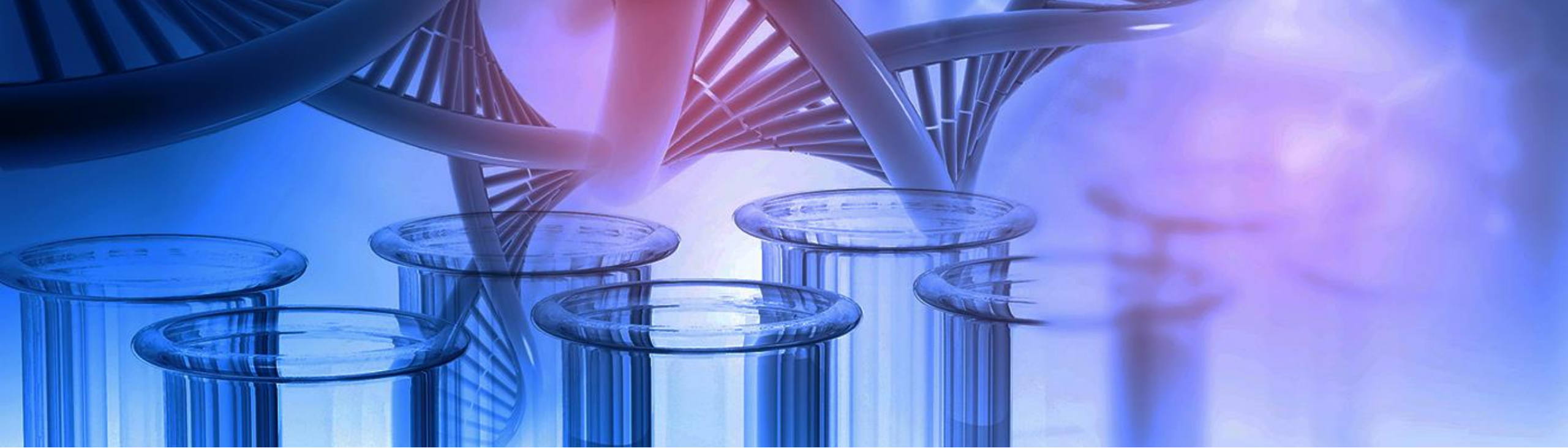


Lorsque l'extraction est réalisée par un solvant organique, ce dernier est éliminé par **évaporation rotative**

Lorsque l'extraction est réalisée par un solvant aqueux (eau), cette dernière est éliminée par **lyophilisation**



Evaporateur rotatif (Rotavapor)



Extraction des acides nucléiques

Extraction des acides nucléiques

- ❑ L'extraction des AN consiste à **isoler les molécules d'ADN ou d'ARN** à partir d'un organisme, un tissu ou des cellules.
- ❑ Il existe de nombreuses méthodes d'extraction d'ADN (des procédures manuelles aux kits commercialisés).

Extraction des acides nucléiques

□ Les principales étapes de l'extraction des AN sont:

Méthode 1 :

Extraction de l'ADN par la méthode de Phénol/Chloroforme

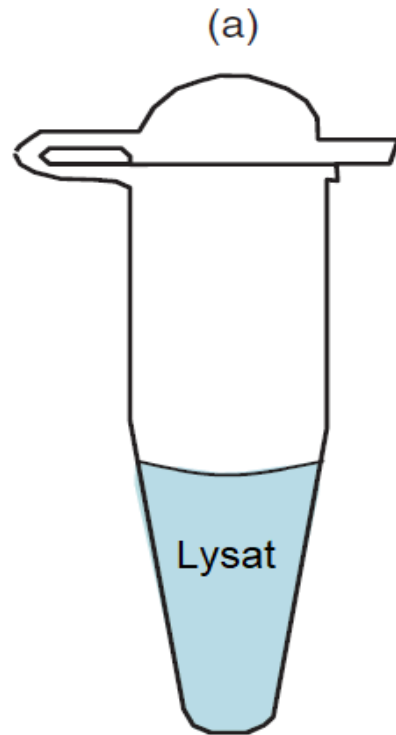
* **Digestion enzymatique par la pronase ou la proteinase K:** On traite souvent l'échantillon par ces enzymes avant l'extraction par le phénol afin de dégrader les protéines cellulaires ce qui facilite leur élimination par le phénol (ces enzymes dégradent aussi les nucléases protégeant les acides nucléiques).

Extraction par méthode de phénol/chloroforme

Pour éliminer les contaminants, différents traitements sont réalisés :

- 1) **Lyse des cellules**. La méthode dépend du type cellulaire.
- 2) Elimination des débris cellulaires par centrifugation
- 3) Le surnageant est ensuite mélangé avec du phénol pour **éliminer les protéines**, le chloroforme est souvent combiné au phénol (le chloroforme permet d'éliminer les traces de phénol)
- 4) Après centrifugation, on obtient deux phases. La phase aqueuse contient les acides nucléiques.
- 5) L'ajout de l'éthanol à la solution aqueuse **précipite les acides nucléiques** qui forment un filament blanc pouvant être récupéré par centrifugation
- 6) Si on veut purifier l'ADN, il suffit d'ajouter des enzymes qui dégradent l'ARN (des RNases).

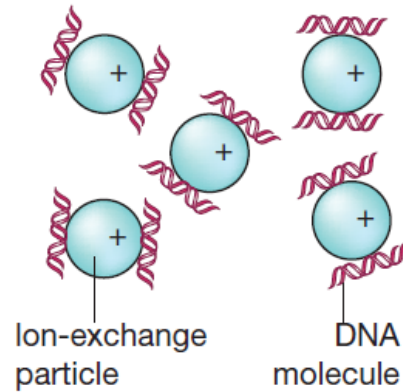
Extraction par méthode de phénol/chloroforme



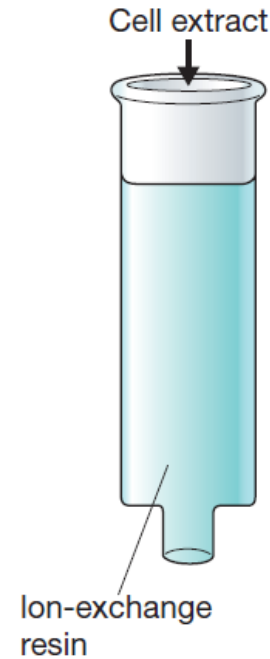
Méthode 2 :

Purification de l'ADN en utilisant la chromatographie sur colonne échangeuse d'ions (CEI)

(a) Attachment of DNA to ion-exchange particles



(b) DNA purification by ion-exchange chromatography



- ❑ Colonne contenant une résine chargée positivement
- ❑ Les molécules de l'échantillon chargées négativement vont s'adsorber sur la résine
- ❑ L'éluion se fait en ajoutant une solution contenant des concentrations de plus en plus importantes de sel
- ❑ Les molécules les plus chargées sont les dernières à être éluées

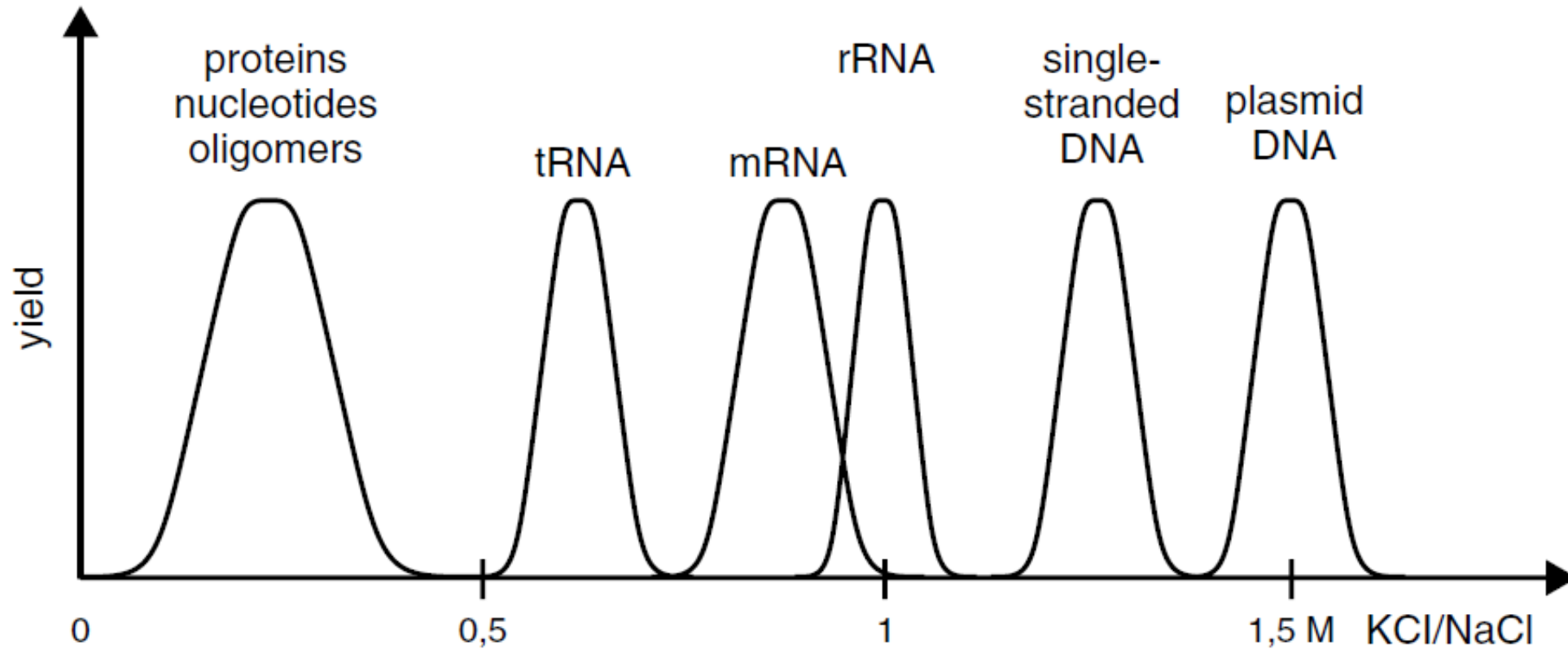
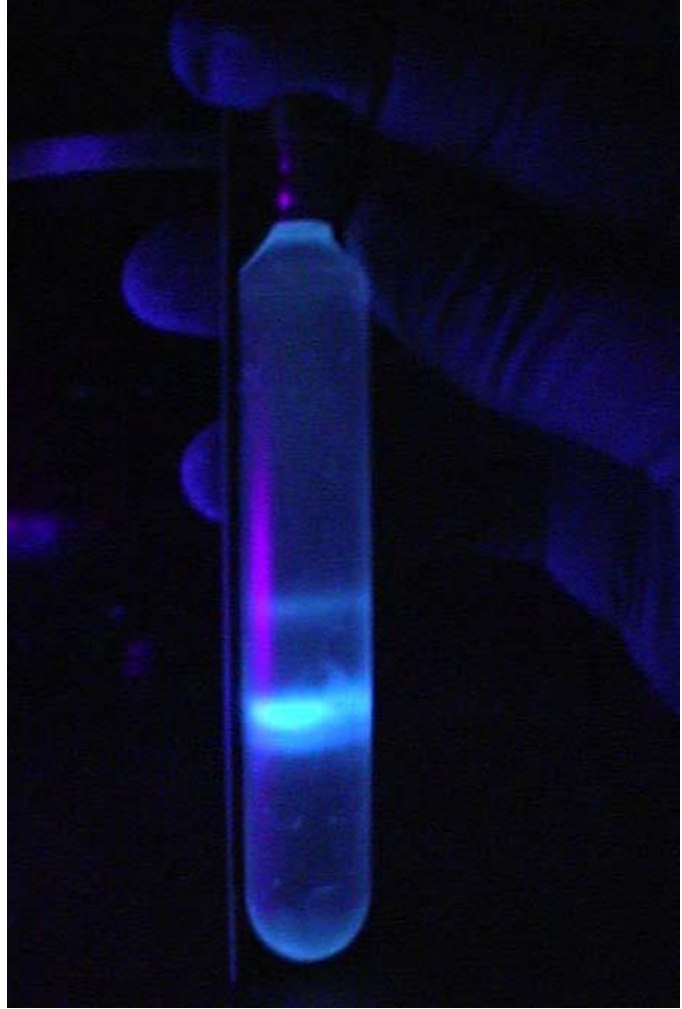
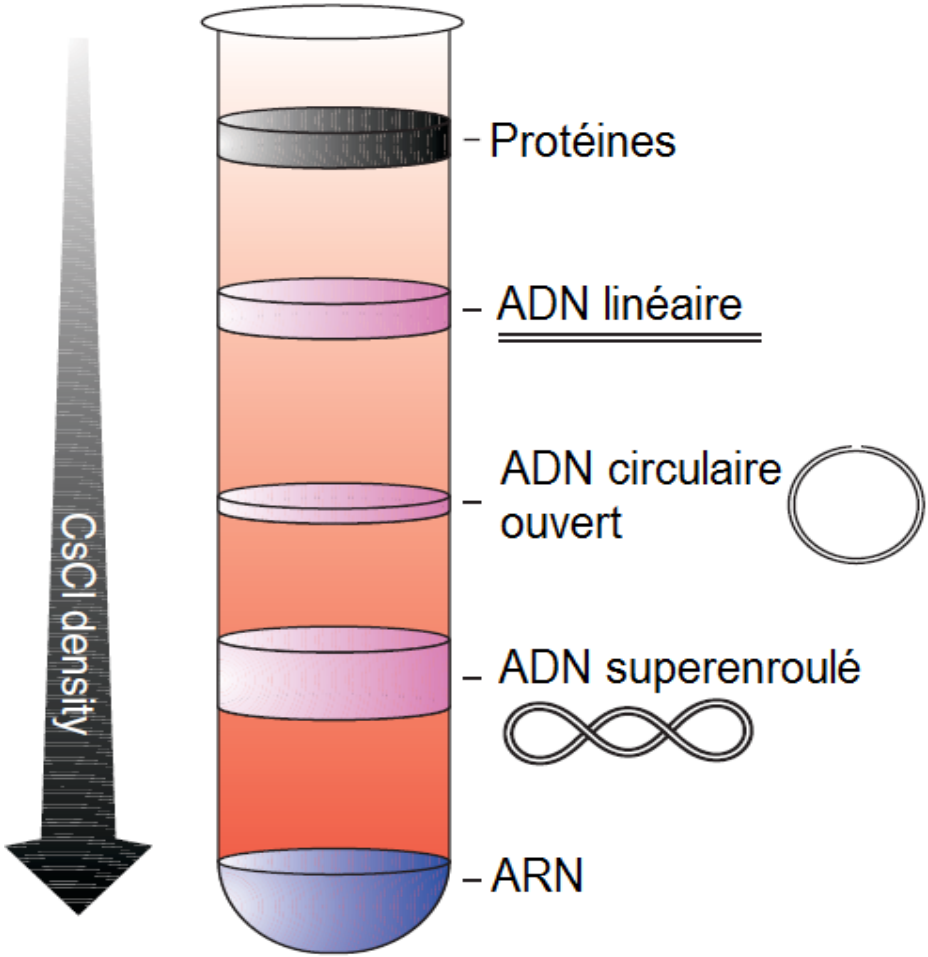
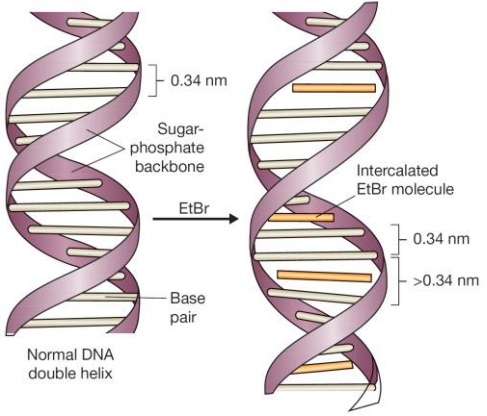
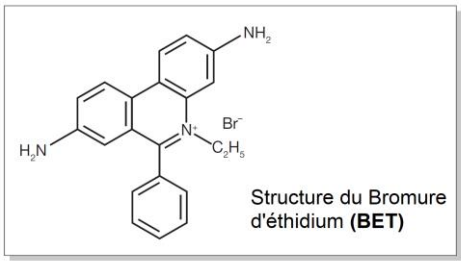


Figure 5. Typical elution patterns of a commercial anion-exchange column at pH 7.0.

The purification of DNA over anion-exchange columns is relatively simple because of the high bonding strength of the DNA to the column matrix. Other nucleic acid structures can also be separated with the aid of such columns if the washing buffers and elution buffers have a suitable ionic strength. The elution pattern depends on the pH, and the pH of the elution buffers usually must be in the range of 8.5 to keep the saline concentration as low as possible (according to Qiagen).

Méthode 3 :

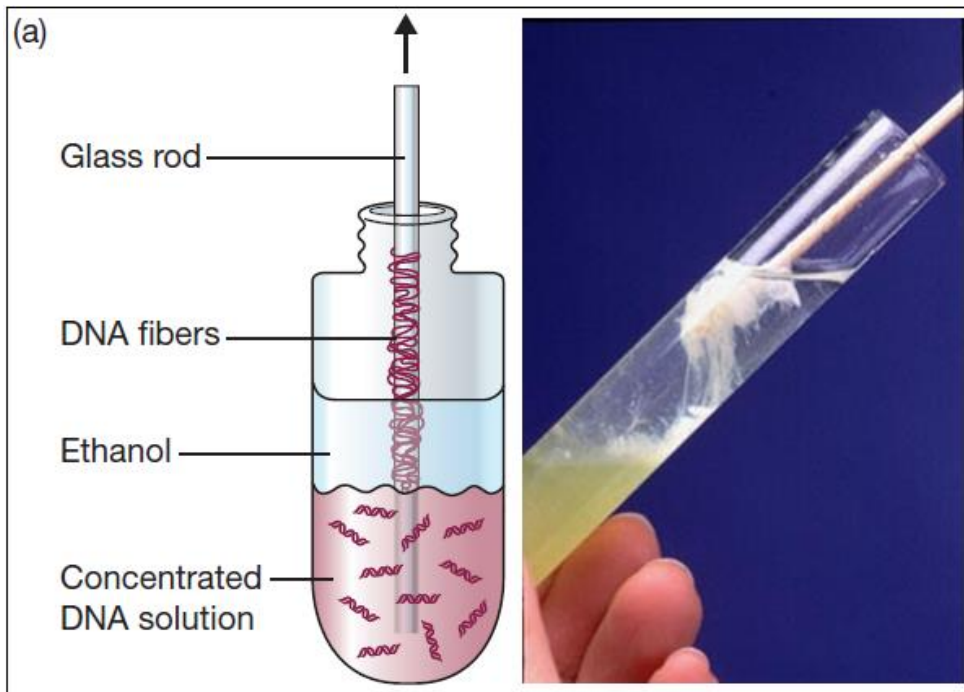
Purification par centrifugation en gradient de CsCl en présence du BEt



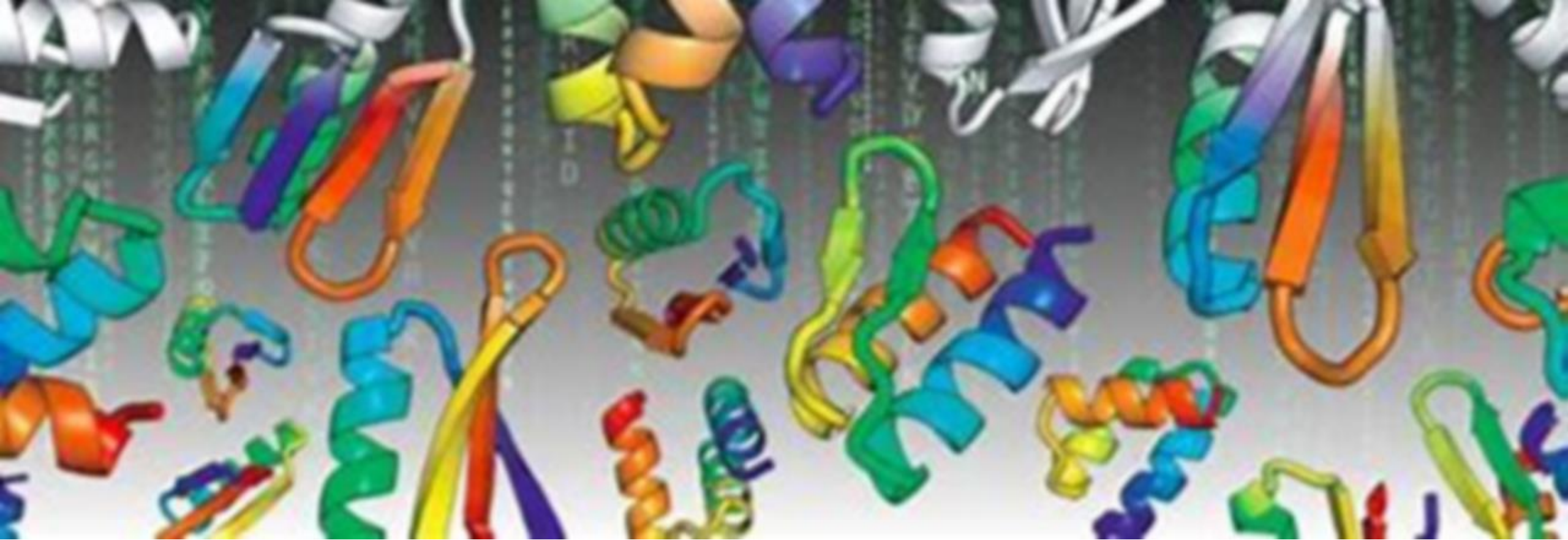
Purification par centrifugation en gradient de CsCl en présence du BET

Concentration des acides nucléiques (par précipitation)

- ❑ La concentration des acides nucléiques purifiés se fait par « **Précipitation** » puis solubilisation dans un volume plus faible
- ❑ On utilise :
 - 1) **Un sel** qui neutralise les charges de l'AN réduisant sa solubilité (ex. acétate de sodium à 0,3M)
 - 2) **Un alcool** qui réduit la solubilité de l'AN au point de le précipiter (ex. éthanol, isopropanol)
- ❑ Conditions : Température de -20°C pendant 1 nuit



- ❑ Après centrifugation, le culot de l'AN est laissé sécher à l'air libre, puis l'AN est resuspendu dans un petit volume de tampon



Extraction/précipitation des protéines

Extraction des protéines

- 1) Commencer par la **lyse** des cellules/tissus pour libérer les protéines (sauf si la protéines est secrétée)
- 2) Le lysat (homogénat) est soumis aux traitements suivants pour extraire les protéines :
 - Centrifugation
 - Précipitation des protéines

Si on désire purifier la protéine, les méthodes suivantes peuvent être utilisées : Ultracentrifugation, chromatographies, précipitation différentielle

Extraction des protéines

(1) Lyse des cellules

(**NB.** Les protéines secrétées ne nécessitent pas une lyse des cellules)

☐ Méthode de lyse :

- Sonication
- Congélation/décongélation
- Broyage mécanique (broyeurs de Potter ou Dounce, Presse Aminco French ...etc.)
- Enzymes

NB. Eviter l'utilisation des agents chimiques qui risquent de dénaturer les protéines (solvants, détergents, variations importantes de pH...etc.)

Le choix de la méthode de lyse est en fonction du type de cellule utilisé, des conditions de purification de la protéine et de l'équipement disponible.

- ❑ Tampon de Lyse : Utiliser un tampon adéquat pour ne pas dénaturer les protéines
 - Force ionique (F_i = concentration en sels) $\approx 0,1$ à $0,2M$
 - pH entre 7 et 8 (*\approx pH physiologique. En plus, dans ce pH, les enzymes protéolytiques qui travaillent à pH acide sont inactives*)
 - Type de tampon : le Tampon Tris et le Tampon phosphate sont le plus communément utilisés
 - Ajouter au tampon de lyse des inhibiteurs de protéases
 - Ajouter également des antioxydants (agents réducteurs) pour protéger les protéines contre l'oxydation (*ex. β -mercaptoetahnol, DTT, glutathione...*)
 - Travailler à température faible ($4^\circ C$) pour mieux préserver les protéines durant les étapes d'extraction

Extraction des protéines

(1) Lyse des cellules

| Type | Function | Commonly Used Reagents |
|---------------------|--|--|
| Reducing Agents | Protect against oxidative damage | 2-mercaptoethanol (BME) Dithiothreitol (DTT) Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) |
| Protease Inhibitors | Inhibit endogenous proteases from degrading proteins | Leupeptin (serine and cysteine protease inhibitor) Pepstatin A (aspartic acid protease inhibitor) PMSF (serine protease inhibitor) |
| Metal Chelators | Inactivate metalloproteases | EDTA EGTA |
| Osmolytes | Stabilize protein structure and enhance solubility | Glycerol Detergents (e.g., CHAPS, NP-40, Triton X-100, DDM) Sugars (e.g., glucose, sucrose) |
| Ionic Stabilizers | Enhance solubility | Salts (e.g., NaCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) |

Table 2. Additives commonly used in protein purification buffers to increase the stability of proteins. Summarized from Thermo Fisher Pierce and Embl.de.

Extraction des protéines

(1) Lyse des cellules

□ Conditions spéciales pour les protéines membranaires

1) Cas des protéines extrinsèques (périphériques)

- Protéines liées à la membrane par des liaisons H et des interactions ioniques
- Nature hydrophile
- Extraction par \uparrow de la F_i (ex. 1M de NaCl) ou en modifiant le pH (acide : 3 à 5 ou basique: 9 à 2)
- Après extraction, les protéines sont purifiées par procédures standards de chromatographie

Extraction des protéines

(1) Lyse des cellules

2) Cas des protéines intrinsèques

- Protéines ancrées dans la membrane, contiennent une région transmembranaire hydrophobe
- Sont faiblement solubles dans les tampons aqueux
- Extraction par des tampons contenant des détergents :
 - *Détergents ioniques* : ex. SDS, CTAB
 - *Détergents non-ioniques* : ex. Triton
- Après extraction, les protéines sont purifiées par procédures standards de chromatographie, cependant:
 - Il est nécessaire d'inclure un détergent dans tous les tampons pour maintenir la protéine soluble
 - La quantité du détergent est 10 à 100 fois plus faible que celle utilisée dans l'extraction (pour minimiser l'interférence du détergent avec le processus chromatographique)

Extraction des protéines

(1) Lyse des cellules

Après lyse des cellules :

- L'homogénat est centrifugé pour éliminer les débris cellulaires
- Le surnageant obtenu contient, à côté des protéines, l'ADN, ARN, lipides et polysaccharides
- Si l'homogénat est visqueux (à cause de l'ADN), on peut utiliser des Dnases pour dégrader l'ADN
- On procède alors à la précipitation des protéines pour les extraire (les séparer des contaminants)

2) Précipitation des protéines

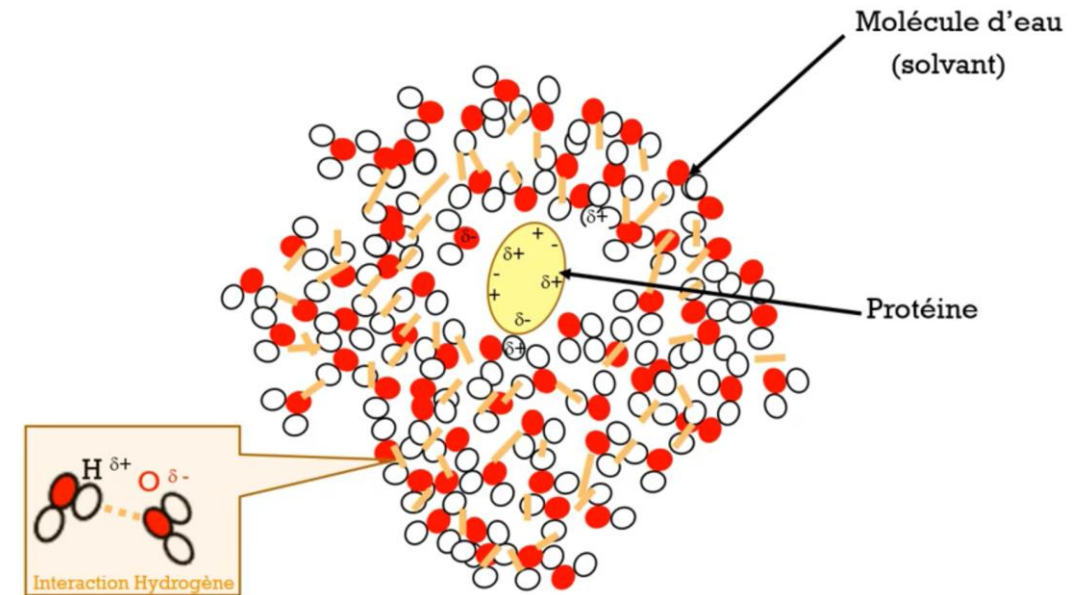
Précipitation des protéines

- ❑ Utilisée afin de concentrer les protéines et de les purifier de divers contaminants.
- ❑ La précipitation des protéines est basée sur la modification du potentiel de solvatation du solvant, en abaissant la solubilité de la protéine par l'ajout d'un réactif (sel, solvant...).

Précipitation des protéines

Solubilité des protéines dans les milieux aqueux :

- ❑ Plus le nombre d'interactions entre la protéine et la molécule d'eau augmente, plus la solubilité augmente (et vice versa)
- La solubilité des protéines dans les tampons aqueux dépend de la distribution des résidus d'acides aminés hydrophiles et hydrophobes à la surface de la protéine.
- Les protéines qui ont une teneur élevée en acides aminés hydrophobes sur la surface ont une faible solubilité dans l'eau.
- Les résidus de surface chargés et polaires interagissent avec les molécules d'eau et augmentent la solubilité d'une protéine.

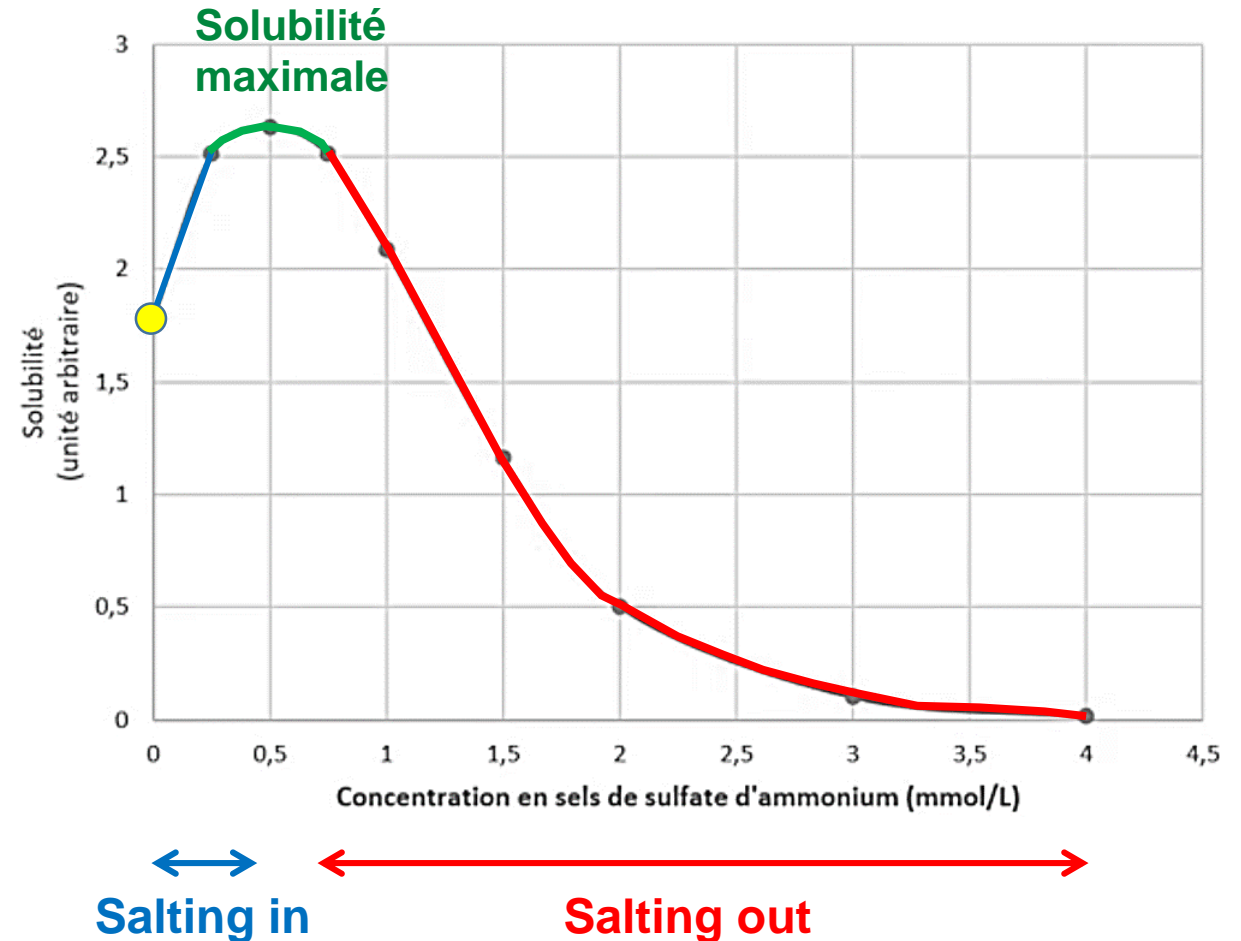


(de nombreuses interactions H sont créées entre les molécules d'eau)

Précipitation des protéines

Effet des sels sur la solubilité des protéines dans les milieux aqueux :

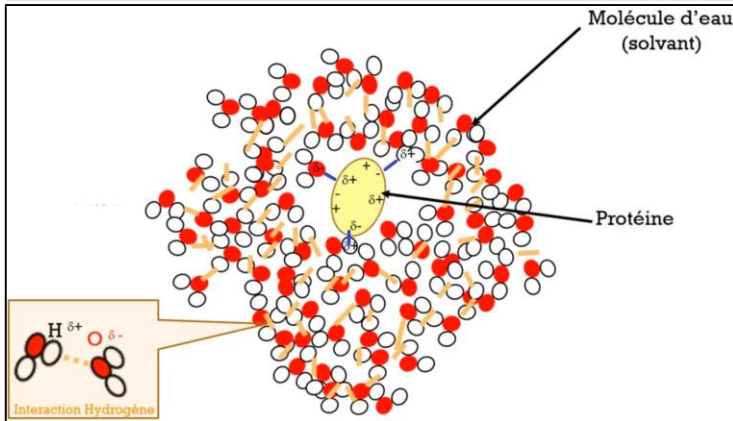
- ❑ A concentration nulle en sel, la solubilité d'une protéine est assez élevée.
- ❑ À faible concentration en sel, la solubilité de la protéine augmente pour atteindre une valeur maximale (Salting in)
- ❑ À concentration élevée en sel, la solubilité de la protéine diminue, et continue à diminuer à fur et à mesure que la concentration du sel augmente (Salting out)



Pour plus d'explication, Consulter la vidéo : <https://youtu.be/C4-GK6Jq1UU>

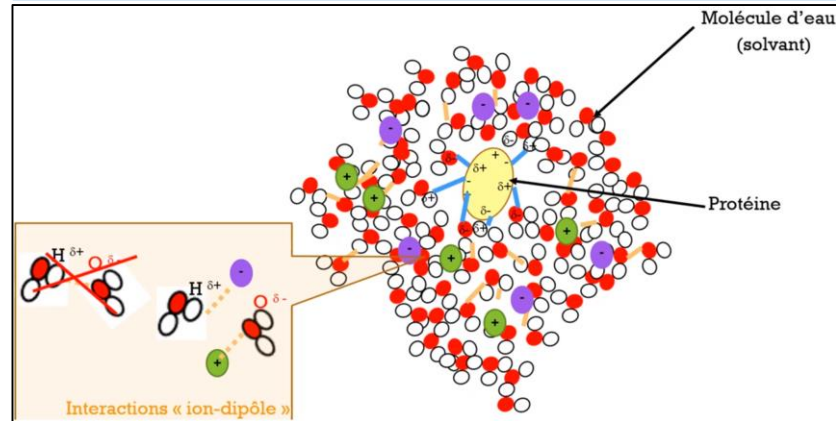
Précipitation des protéines

A concentration **nulle** en sels



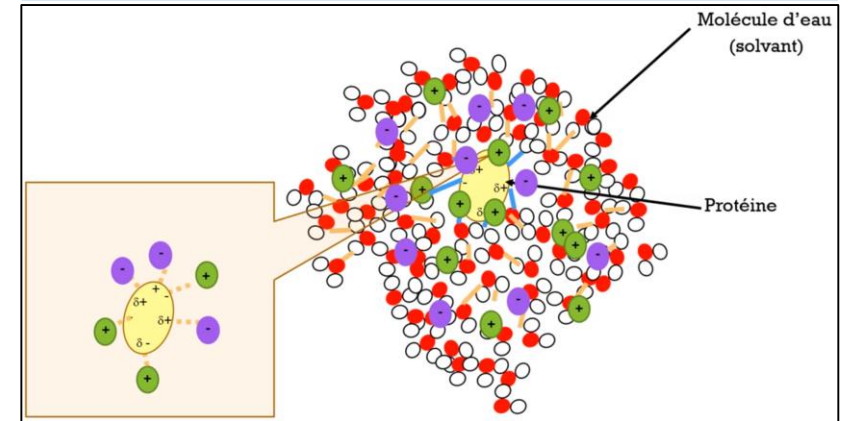
- Les molécules d'eau sont liées par de très nombreuses liaisons hydrogène
- Peu de molécules sont disponibles pour interagir avec les protéines
- La solubilité de la protéines n'est donc pas maximale

A concentrations **moyennes** en sels



- Les ions du sel interagissent avec les molécules d'eau et rompent ainsi les liaisons hydrogène entre ces dernières
- Les molécules d'eau ainsi libérées peuvent désormais interagir avec les protéines (il y a plus de molécules d'eau disponibles)
- La solubilité de la protéine augmente

A concentrations **élevées** en sels



- La présence élevée de cations et d'anions du sel crée une compétition entre ces ions du sel et les molécules d'eau vis-à-vis des protéines
- Les ions du sel interagissent avec les protéines et masquent leurs charges
- Les protéines ne peuvent plus interagir avec les molécules d'eau => elles précipitent

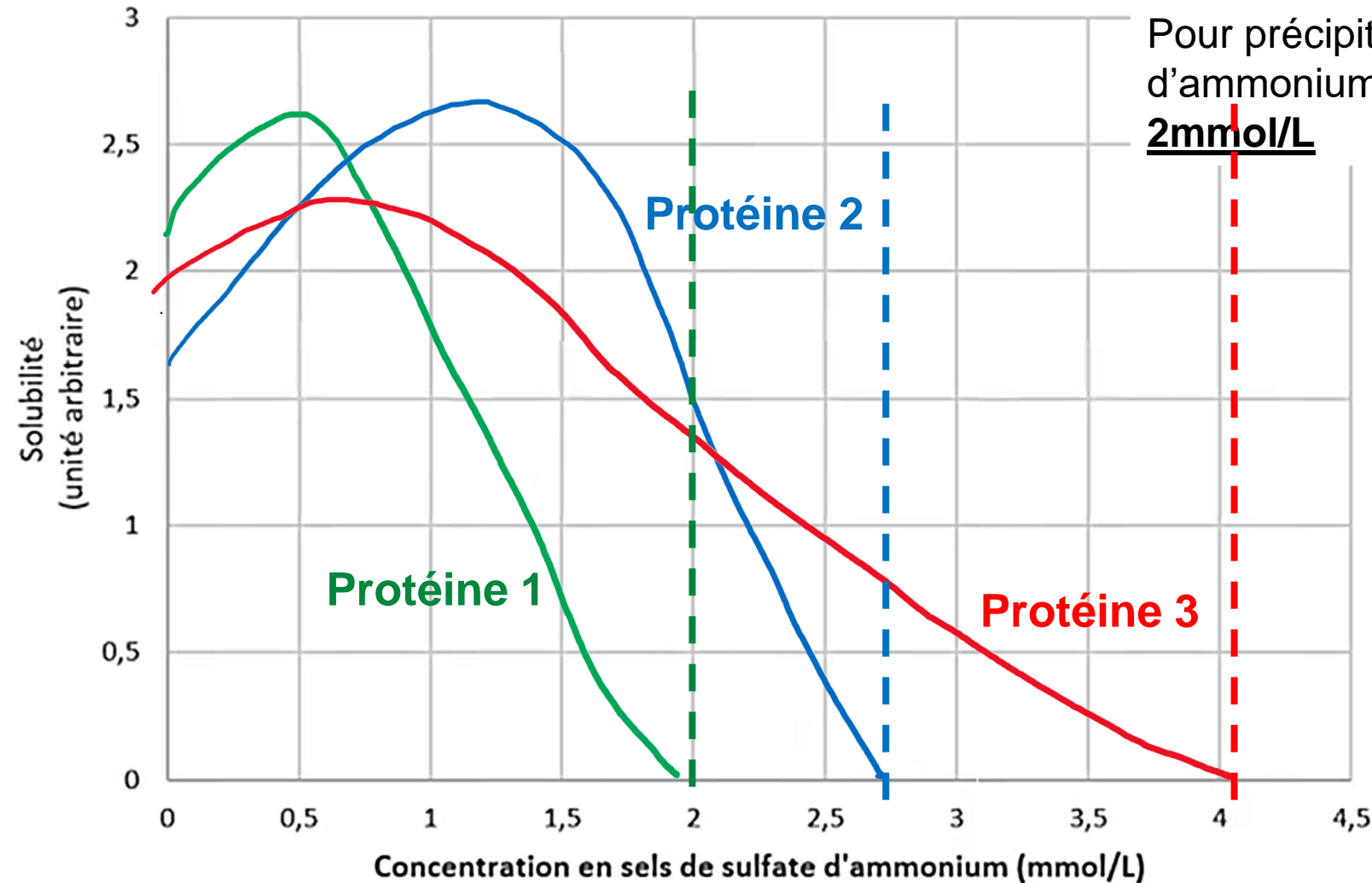
Précipitation des protéines

Précipitation différentielle des protéines par des sels:

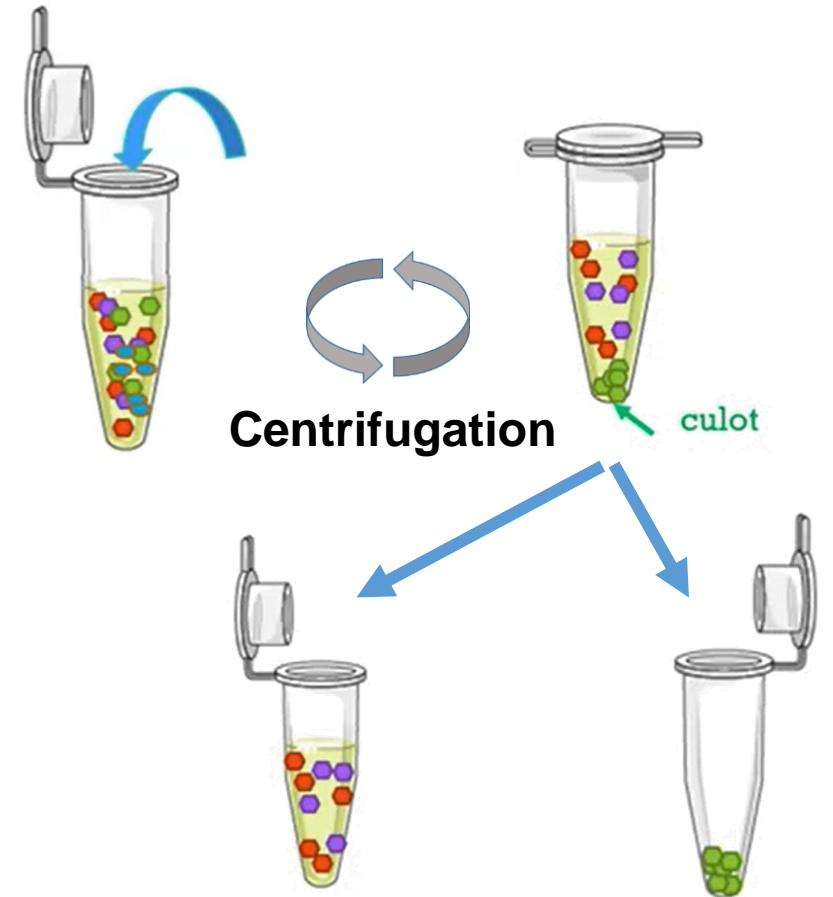
- ❑ Les protéines diffèrent dans leurs solubilités (selon le nombre de résidus polaires qu'elles contiennent).
- ❑ Les sels (comme le sulfate d'ammonium) peuvent être utilisés pour précipiter différentiellement les protéines (par *Salting out*) :
 - les protéines les moins polaires précipitent en premier,
 - les protéines contenant plus de résidus polaires demandent des concentrations plus élevées de sels pour être précipitées.
- ❑ Avantage de la précipitation des protéines par les sels : Cette méthode ne dénature pas les protéines.

Précipitation des protéines

Précipitation différentielle des protéines par des sels:



Pour précipiter la **protéine 1** : ajouter du sulfate d'ammonium pour avoir une concentration de **2mmol/L**



Précipitation des protéines

Précipitation différentielle des protéines par des sels:

| | | Final Percent Saturation to be Obtained | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|--|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 | 100 |
| Starting % saturation | Amount of ammonium sulfate to add (grams) per liter of solution at 20 °C | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 113 | 144 | 176 | 208 | 242 | 277 | 314 | 351 | 390 | 430 | 472 | 516 | 561 | 608 | 657 | 708 | 761 | |
| 5 | 85 | 115 | 146 | 179 | 212 | 246 | 282 | 319 | 357 | 397 | 439 | 481 | 526 | 572 | 621 | 671 | 723 | |
| 10 | 57 | 86 | 117 | 149 | 182 | 216 | 251 | 287 | 325 | 364 | 405 | 447 | 491 | 537 | 584 | 634 | 685 | |
| 15 | 28 | 58 | 88 | 119 | 151 | 185 | 219 | 255 | 292 | 331 | 371 | 413 | 456 | 501 | 548 | 596 | 647 | |
| 20 | 0 | 29 | 59 | 89 | 121 | 154 | 188 | 223 | 260 | 298 | 337 | 378 | 421 | 465 | 511 | 559 | 609 | |
| 25 | | 0 | 29 | 60 | 91 | 123 | 157 | 191 | 227 | 265 | 304 | 344 | 386 | 429 | 475 | 522 | 571 | |
| 30 | | | 0 | 30 | 61 | 92 | 126 | 160 | 195 | 232 | 270 | 309 | 351 | 393 | 438 | 485 | 533 | |
| 35 | | | | 0 | 30 | 62 | 94 | 128 | 163 | 199 | 236 | 275 | 316 | 358 | 402 | 447 | 495 | |
| 40 | | | | | 0 | 31 | 63 | 96 | 130 | 166 | 202 | 241 | 281 | 322 | 365 | 410 | 457 | |
| 45 | | | | | | 0 | 31 | 64 | 97 | 132 | 169 | 206 | 245 | 286 | 329 | 373 | 419 | |
| 50 | | | | | | | 0 | 32 | 65 | 99 | 135 | 172 | 210 | 250 | 292 | 335 | 381 | |
| 55 | | | | | | | | 0 | 33 | 66 | 101 | 138 | 175 | 215 | 256 | 298 | 343 | |
| 60 | | | | | | | | | 0 | 33 | 67 | 103 | 140 | 179 | 219 | 261 | 305 | |
| 65 | | | | | | | | | | 0 | 34 | 69 | 105 | 143 | 183 | 224 | 266 | |
| 70 | | | | | | | | | | | 0 | 34 | 70 | 107 | 146 | 186 | 228 | |
| 75 | | | | | | | | | | | | 0 | 35 | 72 | 110 | 149 | 190 | |
| 80 | | | | | | | | | | | | | 0 | 36 | 73 | 112 | 152 | |
| 85 | | | | | | | | | | | | | | 0 | 37 | 75 | 114 | |
| 90 | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 37 | 76 | |
| 95 | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 38 | |